

Funktion und Evolution chloroplastidärer PPR-Proteine

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Susanne Beick, geb. Busch

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber

2. Prof. Dr. Jörg Nickelsen

3. Prof. Dr. Rudolf Ehwald

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2010

Zusammenfassung

PPR-Proteine bilden die größte Familie von RNA-bindenden Proteinen in Pflanzen und die überwiegende Mehrheit ihrer Mitglieder wird in die Mitochondrien oder Plastiden importiert, wo sie eine wesentliche Rolle im RNA-Metabolismus definierter Transkripte spielen (Small und Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). Doch die Funktionsweise dieser Proteine ist noch weitestgehend unbekannt. Nur wenige PPR-Proteine sind bisher im Detail analysiert worden und noch seltener ist es gelungen, ihre RNA-Liganden *in vivo* zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das chloroplastidäre PPR-Protein PPR5 in *Zea mays* funktionell charakterisiert, dessen Ortholog in *Arabidopsis thaliana* essentiell für die Embryonalentwicklung ist (Cushing *et al.*, 2005). Mittels PPR5-Immunopräzipitation und einer Analyse der kopräzipitierten RNA konnte *in vivo* eine spezifische Assoziation mit der ungespleißten tRNA-Glycin (UCC) nachgewiesen werden. Diese Studien wurden durch Analysen von *ppr5*-Mais-Mutanten ergänzt. Dabei konnte ein Stabilitätsverlust der Vorläufer der tRNA-Glycin in *ppr5*-Mutanten gezeigt werden. Es wurde geschlussfolgert, dass die Interaktion mit PPR5 das Transkript vor einem endonukleolytisch initiierten RNA-Abbau schützt. PPR5 ist somit notwendig für die plastidäre Translation.

Weiterhin wurden die nächsten Verwandten von PPR5 (PPR2, PPR50 und PPR51) in Mais identifiziert. Northern-Analysen von *ppr2*-Mutanten zeigten eine reduzierte Akkumulation der Intron-enthaltenden plastidären tRNA-Valin (UAC) und tRNA-Isoleucin (GAU) im Vergleich zu Wildtypen. Darüber hinaus wurden Mutantenlinien für *ppr50* und *ppr51* isoliert und erste Analysen mit diesen durchgeführt. Das schuf die Voraussetzung für eine weiterführende Charakterisierung der vier Paralogen, die zukünftig Auskunft über die Konservierung der Funktion oder Spezifität nahe verwandter PPR-Proteine geben kann.

In einem dritten Projekt ist es gelungen, Mais-Mutanten für das plastidäre Protein PPR54, dessen Funktion in *Arabidopsis thaliana* bereits bekannt war (M. Tillich, nicht veröffentlicht), zu identifizieren. Dies ermöglichte die erstmalige funktionelle Untersuchung orthologer PPR-Proteine in einer mono- und einer eudikotylen Pflanze. Dabei konnte gezeigt werden, dass PPR54 in Mais, ebenso wie in *Arabidopsis*, für das Spleißen des *ndhA*-Introns benötigt wird. Interessanterweise weist die isolierte *ppr54*-Mutante einen stärkeren phänotypischen Defekt auf als die *Arabidopsis*-Mutante, was auf Unterschiede der beiden Pflanzenarten in der Kohlenstoff-Fixierung zurückzuführen sein könnte.

Die hier vorgelegten Analysen ausgesuchter PPR-Proteine mündeten in drei wesentlichen Schlussfolgerungen zur Funktion von PPR-Proteinen allgemeingültiger Art. So üben chloroplastidäre PPR-Proteine, die in Eudikotylen wie *Arabidopsis* für die Embryogenese notwendig sind, in der Regel eine Funktion in der plastidären Translation aus. Zum zweiten offenbarte die PPR5-Analyse eine möglicherweise für PPR-Proteine ursprüngliche Funktionsweise, die nicht die Rekrutierung anderer, katalytisch aktiver Effektorproteine erfordert, sondern der ein passiver, auf der reinen Bindung einer RNA beruhender Mechanismus zugrunde liegt. Schließlich konnte eine Konservierung der Funktion orthologer PPR-Proteine in mono- und eudikotylen Pflanzen, wie sie bereits postuliert wurde (O'Toole *et al.*, 2008), am Beispiel von PPR54 experimentell nachgewiesen und somit klar untermauert werden.

Summary

PPR proteins are the largest family of RNA binding proteins in plants and the vast majority of them is localized to mitochondria or chloroplasts, where they are major players in the RNA metabolism of defined transcripts (Small and Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). However, the mechanistic function of these proteins is still not clear. Only few PPR proteins have been analyzed in detail so far and for even less, an *in vivo* RNA ligand has been identified.

In this study, the plastid PPR protein PPR5, whose ortholog in *Arabidopsis thaliana* is embryo-essential (Cushing *et al.*, 2005), was functionally characterized in *Zea mays*. By PPR5 immunoprecipitation and analyses of the coimmunoprecipitated RNA, a specific association to the unspliced tRNA glycine (UCC) was shown *in vivo*. The analysis of *ppr5* maize mutants demonstrated a loss of stability of the tRNA precursor in mutants. It was concluded that the interaction with PPR5 protects the unspliced tRNA from endonucleolytic decay. Thus, PPR5 is necessary for translation in plastids.

In addition, close relatives of PPR5 were identified in maize (PPR2, PPR50, and PPR51) by phylogenetic means. Northern analyses of *ppr2* mutants demonstrated a reduced accumulation of the plastid intron containing tRNA valine (UAC) and tRNA isoleucine (GAU) relative to wild-type. Maize mutants for *ppr50* and *ppr51* were isolated and first analyses were performed. This is a prerequisite for a future characterization of four paralogous PPR proteins which might answer whether closely related PPR proteins have similar functions or RNA targets.

In the third project of this study, a maize mutant for PPR54, a protein with a known function in *Arabidopsis* (M. Tillich, unpublished data), was obtained. This, for the first time, provided the opportunity to determine the functions of orthologous PPR proteins of a monocotyledonous and an eudicotyledonous plant. It was demonstrated that PPR54 is needed for the splicing of the *ndhA* intron in maize as it is in *Arabidopsis*. Interestingly, the phenotypic defects of the maize mutants are stronger than those of the *Arabidopsis* mutants. A possible reason for that could be differences in carbon fixation metabolism between both plant species.

Three important conclusions concerning the function of PPR proteins in general were drawn from the studies of chosen PPR proteins presented here. First, plastid PPR proteins that are essential in embryo development in eudicots like *Arabidopsis* should be necessary for plastid translation in most cases. Second, the characterization of PPR5 revealed a possibly ancient functional mechanism of PPR proteins which does not invoke the recruitment of additional

catalytic factors but relies on the passive binding of RNA elements. Last, the conservation of function of orthologous PPR proteins in monocots and eudicots was shown in the case of PPR54, confirming earlier postulations of a functional conservation of orthologous PPR proteins in angiosperms (O'Toole *et al.*, 2008) experimentally.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Summary	4
1 Einleitung	11
1.1 Plastiden: von Endosymbionten zu Zellorganellen	11
1.1.1 Struktur und Funktion von Plastiden	11
1.1.2 Das Plastidengenom und -proteom	12
1.1.3 Der chloroplastidäre RNA-Metabolismus	15
1.2 PPR-Proteine	18
1.2.1 Das Pentatricopeptid-Motiv und die Struktur von PPR-Proteinen	19
1.2.2 Verbreitung und Evolution von PPR-Proteinen	21
1.2.3 Die Funktion von PPR-Proteinen im organellären RNA-Metabolismus	24
1.3 Unterschiede in der Rolle der Plastiden in <i>Zea mays</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
1.4 Zielstellung	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Pflanzenmaterial	33
2.1.2 Bakterienstämme	34
2.1.3 Oligonukleotide	34
2.1.4 Chemikalien	34
2.1.5 Radiochemikalien	34
2.1.6 DNA- und RNA-Längenmarker und Protein-Molekulargewichtsstandards	35
2.1.7 Enzyme	35
2.1.8 Kits	35
2.1.9 Membranen, Filterpapiere, Röntgenfilme und <i>screens</i>	36

2.1.10	Antikörper und Seren	36
2.1.11	<i>Software</i> -Programme und -Algorithmen zur Sequenzanalyse	37
2.2	Methoden	37
2.2.1	Pflanzenanzucht	37
2.2.1.1	Aussaat und Kultivierung von <i>Zea mays</i>	37
2.2.1.2	Aussaat und Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.2.2	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.3	Isolation von Nukleinsäuren	38
2.2.3.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)	38
2.2.3.2	Isolation von genomischer DNA	39
2.2.3.3	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel	39
2.2.3.4	Isolation von RNA	40
2.2.4	Reinigung, Konzentration und Quantifizierung von Nukleinsäuren	40
2.2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.2.5.1	Kolonie-PCR	41
2.2.6	Synthese und Markierung von Hybridisierungssonden	41
2.2.7	Synthese von cDNA	42
2.2.7.1	DNase-Verdau von RNA	42
2.2.7.2	Reverse Transkription	42
2.2.8	Bestimmung von Transkriptenden	42
2.2.8.1	Behandlung mit <i>tobacco acid pyrophosphatase</i> (TAP)	43
2.2.8.2	RNA-Zirkularligation	43
2.2.8.3	5'-RACE-Technik	43
2.2.9	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	44
2.2.10	Klonierung in <i>E. coli</i>	45
2.2.10.1	Ligation	45
2.2.10.2	Transformation	45
2.2.11	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese	45

2.2.11.1	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	45
2.2.11.2	Auftrennung von RNA im Agarosegel	46
2.2.11.3	Auftrennung von RNA oder cDNA im denaturierenden Polyacrylamidgel	46
2.2.12	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren mit DNA-Sonden	47
2.2.12.1	Southern-Transfer	47
2.2.12.2	Southern-Hybridisierung	47
2.2.12.3	Northern-Transfer	48
2.2.12.4	Northern-Hybridisierung	48
2.2.13	<i>Primer extension</i> - und <i>poisoned primer extension</i> -Analyse	49
2.2.14	DNA-Sequenzierung	49
2.2.15	Isolation von Transposon-induzierten Mais-Mutanten	50
2.2.16	Methoden zur Analyse von Proteinen	51
2.2.16.1	Isolation von Gesamt-Protein	51
2.2.16.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	51
2.2.16.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
2.2.16.4	Western-Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteinproben und Immunodetektion	52
2.2.17	Methoden zur Gewinnung polyklonaler Kaninchen-Antikörper	53
2.2.17.1	Heterologe Expression rekombinanter Polypeptide (Antigene)	53
2.2.17.2	Affinitätsaufreinigung von Antiseren	53
2.2.18	Immunopräzipitation chloroplastidärer Proteine	54
2.2.18.1	Isolation von Mais-Chloroplasten	54
2.2.18.2	Extraktion von Chloroplastenstroma	54
2.2.18.3	Immunopräzipitation	54
2.2.19	RNA-Immunopräzipitation und Chip-Analyse (RIP-Chip)	54
2.2.20	<i>Slot blot</i> -Analyse	55
2.2.21	<i>Run on</i> -Transkriptionsanalyse	56

3	Ergebnisse	57
3.1	Analyse des in <i>Arabidopsis</i> Embryo-essentiellen PPR-Proteins PPR5 in Mais	57
3.1.1	Identifikation der Ziel-RNA von PPR5	57
3.1.2	<i>ppr5</i> -Mutanten	60
3.1.3	Akkumulation der plastidären tRNA-Glycin in <i>ppr5</i> -Mutanten	64
3.1.4	Analyse des tRNA-Glycin-Spleißens in <i>ppr5</i> -Mutanten	66
3.1.5	Vergleichende Kartierung von tRNA-Enden	67
3.1.6	Bestimmung der <i>trnG</i> -Transkription durch <i>run on</i> -Analyse	69
3.1.7	Detektion eines 3'-Degradationstranskripts durch <i>primer extension</i> -Analyse	71
3.2	Analyse paraloger PPR-Proteine in <i>Zea mays</i>: PPR2, PPR50 und PPR51	73
3.2.1	Identifikation von mit <i>ppr5</i> phylogenetisch nah verwandten PPR-Genen in Mais	74
3.2.2	PPR-Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
3.2.3	Revers genetische Isolation von PPR-Mutanten aus <i>Zea mays</i>	83
3.2.4	Akkumulation von Photosynthesekomplexen in <i>ppr50</i> - und <i>ppr51</i> -Mutanten	87
3.2.5	Spezifische Defekte in der Transkriptakkumulation in <i>ppr2</i> -Mutanten	89
3.2.6	Akkumulation von plastidären tRNAs in <i>ppr50</i> -Mutanten	91
3.2.7	Akkumulation von plastidären tRNAs in <i>ppr51</i> -Mutanten	93
3.3	Die Funktion von orthologen PPR-Proteinen: Analyse von PPR54 in <i>Zea mays</i>	95
3.3.1	Identifikation einer <i>ppr54</i> -Mais-Mutante	95
3.3.2	Analyse des Edierungsstatus von <i>ndhA-3</i>	98
3.3.3	Analysen der <i>ndhA</i> -Transkriptakkumulation in <i>ppr54</i> -Pflanzen	100

4	Diskussion	102
4.1	PPR5 stabilisiert den ungespleißten Vorläufer einer plastidären tRNA in Mais	103
4.1.1	PPR-Proteine als Schutzfaktoren organellärer Transkripte	105
4.1.2	Eine duale Funktion von PPR5 in der Biogenese der tRNA-Glycin (UCC)	107
4.2	Die Funktion von orthologen PPR-Proteinen in Angiospermen	109
4.2.1	Die Funktion von PPR54 ist konserviert in <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Zea mays</i>	109
4.2.2	Der Einfluss von PPR54 auf die Edierung von <i>ndhA-3</i> in Mais und Tabak	111
4.3	Phänotypen von PPR-Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Zea mays</i>	114
4.3.1	Bedeutung der plastidären Translation für die Embryogenese in Eudikotylen	114
4.3.2	Die Rolle von PPR50 in Mais und <i>Arabidopsis</i>	118
4.3.3	Der <i>ndh</i> -Phänotyp von <i>ppr54</i> -Mutanten in Mais und <i>Arabidopsis</i>	120
4.4	Was kann die Phylogenie von PPR-Proteinen über ihre Funktionen offenbaren?	121
	Literaturverzeichnis	123
Anhang 1:	Begriffsdefinitionen Orthologie und Paralogie	142
Anhang 2:	Verwendete Oligonukleotide	143
Anhang 3:	PPR5-RIP-Chip-Daten	146
	Abkürzungsverzeichnis	147
	Danksagung	152
	Wissenschaftliche Beiträge	153
	Selbstständigkeitserklärung	154

1 Einleitung

1.1 Plastiden: von Endosymbionten zu Zellorganellen

Von entscheidender Bedeutung für die Evolution der pflanzlichen Zelle waren zwei Endosymbiose-Ereignisse. Zunächst führte die Aufnahme eines freilebenden Vorfahren rezenter α -Proteobakterien durch eine Wirtszelle zur Entstehung der Mitochondrien (Lang *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2001). Obwohl noch immer kontrovers diskutiert, mehrten sich die Hinweise, dass dies sogar den Ursprung der eukaryotischen Zelle selbst darstellt. Denn erst mit der Inkorporation der Mitochondrien-Ahnen und der damit verbundenen Etablierung von effizient Energie umwandelnden Organellen war die Entwicklung eukaryotischer Charakteristika, wie einem großen Genom innerhalb eines Zellkerns, energetisch ermöglicht (Vellai *et al.*, 1997; Embley und Martin, 2006; Davidov und Jurkevitch, 2009).

Nach der Rekrutierung der Mitochondrien kam es dann innerhalb eines Zweigs der frühen Eukaryoten zu einer Endosymbiose, welche die Fähigkeit der Algen und Pflanzen zur Photosynthese begründet: die Aufnahme der Plastiden-Vorläufer, die in der Verwandtschaft der Cyanobakterien zu suchen sind (Raven und Allen, 2003; initial formuliert von Mereschkowsky, 1905). Die langen Operons der plastidären Genome zeigen ihren eubakteriellen Ursprung und lassen in ihrer zum Teil konservierten Gen-Anordnung vermuten, dass alle Plastiden auf nur ein primäres Endosymbiose-Ereignis zurückzuführen sind (Kowallik, 1994; McFadden und van Dooren, 2004). Durch nachfolgende Phagozytosen eukaryotischer, bereits cyanobakterielle Symbionten enthaltender Einzeller entstanden innerhalb der Eukaryoten zahlreiche Linien, die Plastiden aufweisen. Die mittels der sogenannten sekundären Endosymbiose inkorporierten Zellen unterlagen dramatischen Reduktionen, heute zeugen vornehmlich die komplexen Hüllmembranen dieser Plastiden von ihrer Herkunft (McFadden, 2001; Gould *et al.*, 2008).

1.1.1 Struktur und Funktion von Plastiden

Ihrem bakteriellen Ursprung entsprechend, können Plastiden nicht *de novo* gebildet werden, sondern nur durch Teilung auseinander hervorgehen (zytologische Kontinuität). Die Plastiden verschiedener Gewebe innerhalb einer Pflanze genügen dabei unterschiedlichen Anforderungen und weisen variable Morphologien und spezifische Genexpressionsmuster auf. Un-

differenzierte Plastiden-Vorläufer der Meristeme, die Proplastiden, sind bereits in der Zygote vorhanden. Aus ihnen können alle anderen Plastiden-Typen entstehen. Leukoplasten sind nicht-pigmentierte Plastiden, die primär der Speicherung von Stärke (Amyloplasten), Lipiden (Elaioplasten) oder Proteinen (Proteinoplasten) dienen. Chromoplasten akkumulieren Karotinoide und geben Blüten und Früchten ihre Farben. Die dominierende und am besten untersuchte Differenzierungsform der Plastiden jedoch sind die Chlorophyll enthaltenden Chloroplasten, die in allen grünen Geweben vorkommen und die Fixierung von Kohlendioxid mittels Photosynthese ermöglichen. Neben der Differenzierung aus Proplastiden können verschiedene Plastiden-Typen durch Redifferenzierung auseinander hervorgehen (Übersicht in Pyke, 2007; Bauer *et al.*, 2001).

Die Plastiden der Pflanzen sind durch die primäre Endosymbiose entstanden und als solche von zwei Membranen umgeben, welche auf die Plasmamembran und die äußere Membran des gram-negativen Symbionten zurückzuführen sind. Eine phagozytotische, vom Wirt stammende Membran ist nicht nachweisbar (Gould *et al.*, 2008).

Den inneren Aufbau der Chloroplasten bestimmt ein drittes Membransystem, das der Thylakoide. Sie bilden ein hochkomplexes Gebilde aus Lamellen und Grana und grenzen das Lumen als Kompartiment innerhalb der Chloroplasten ab. Die Thylakoidmembranen beherbergen mit den Photosystemkomplexen den Ort des Licht-abhängigen Elektronentransports zur Bildung von ATP und Reduktionsäquivalenten. Im Chloroplastenstroma wird durch die RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) Licht-unabhängig Kohlendioxid fixiert. Auch die Speicherung des organischen Kohlenstoffs, in Form von Stärke, geschieht in Pflanzen in den Plastiden (Pyke, 2007; Waters und Langdale, 2009).

Doch der Einfluss des Endosymbionten auf den zellulären Metabolismus geht über die Photosynthese hinaus. Die Plastiden der Pflanzen werden für die Synthese der aromatischen Aminosäuren, zur Fettsäure-Synthese, zur Nitrat-Assimilation und zur Häm-Synthese benötigt. Weiterhin ergänzt der plastidäre Isopentenyl-Stoffwechsel den zytosolischen der Pflanzenzelle (Gould *et al.*, 2008).

1.1.2 Das Plastidengenom und -proteom

Von ihren prokaryotischen Vorfahren haben sich die Plastiden ein eigenes proteinsynthetisierendes System und ein Genom, das Plastom, bewahrt. Es wird üblicherweise als zirkuläres, doppelsträngiges Molekül dargestellt (siehe Abb. 1), liegt tatsächlich aber auch in

diversen linearen oder multimeren Konformationen vor (zusammengefasst in Bock, 2007). Jeder Plastid enthält zahlreiche Genomkopien, organisiert als Nucleo-Proteinkomplexe im Nucleoid (Sato *et al.*, 2003).

Das Plastom von Landpflanzen ist in vier Abschnitte gegliedert: großer und kleiner Einzelkopiebereich (*large* und *small single copy region*, LSC und SSC), getrennt voneinander durch zwei Bereiche invertierter Repetitionen (IR_A und IR_B). Letztere sind identisch in ihrer Sequenz, aber gegenläufig im zirkulären Molekül orientiert (Abb. 1). Insgesamt umfasst die Sequenz je nach untersuchter Art etwa 120 bis 160 kb, ca. 115 Gene werden kodiert. Die meisten dieser Gene werden für die plastidäre Genexpression benötigt. Es handelt sich dabei z. B. um tRNA- und rRNA-Gene sowie um Gene für ribosomale Proteine und für die Untereinheiten der plastidär kodierten plastidären RNA-Polymerase PEP. Eine ebenfalls beträchtliche Anzahl an Genen kodiert Proteine, die an der Photosynthese beteiligt sind (Sugiura, 1989; aktuelle Übersicht in Bock, 2007).

Die genetische Konstitution der Organellen genügt jedoch nicht ihrer komplexen Biochemie (Martin und Herrmann, 1998). Plastidengenome kodieren nur etwa 15 bis 209 Proteine des plastidären Proteoms (Keeling und Palmer, 2008), bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* sind es 87 (Abdallah *et al.*, 2000). Demgegenüber sind etwa 2100 plastidäre Proteine nukleär kodiert (Richly und Leister, 2004). Auch besteht eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Kodierungskapazität von Plastomen und jener der Genome rezenter Cyanobakterien. Daraus wurde gefolgert, dass es im Laufe der Plastiden-Evolution zu einer massiven Reduktion des Plastoms gekommen sein muss, einhergehend mit einem Transfer ursprünglich organellär kodierter Gene in den Nukleus. Berechnungen zufolge sind zwischen 14 und 18% der Kern-kodierten Gene von *A. thaliana* cyanobakterieller Abstammung (Martin *et al.*, 2002; Deusch *et al.*, 2008). Zum Teil gelangen diese Kern-kodierten Proteine mit Hilfe von Transitsequenzen über eine Protein-Importmaschinerie zurück in die Plastiden (Jarvis und Robinson, 2004). Der vermutlich weitaus größere Teil jedoch erfüllt inzwischen Funktionen in anderen Zellkompartimenten (Martin *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite übernehmen Kern-kodierte Proteine, die nicht der Endosymbiont beigesteuert hat, inzwischen Aufgaben im Plastiden (Abdallah *et al.*, 2000; Richly und Leister, 2004; Stern *et al.*, 2004). Im Rahmen der langen Koevolution des ursprünglich heterotrophen Eukaryoten und der aufgenommenen autotrophen Prokaryoten hat sich eine obligate Symbiose zwischen ihnen entwickelt (Gould *et al.*, 2008).

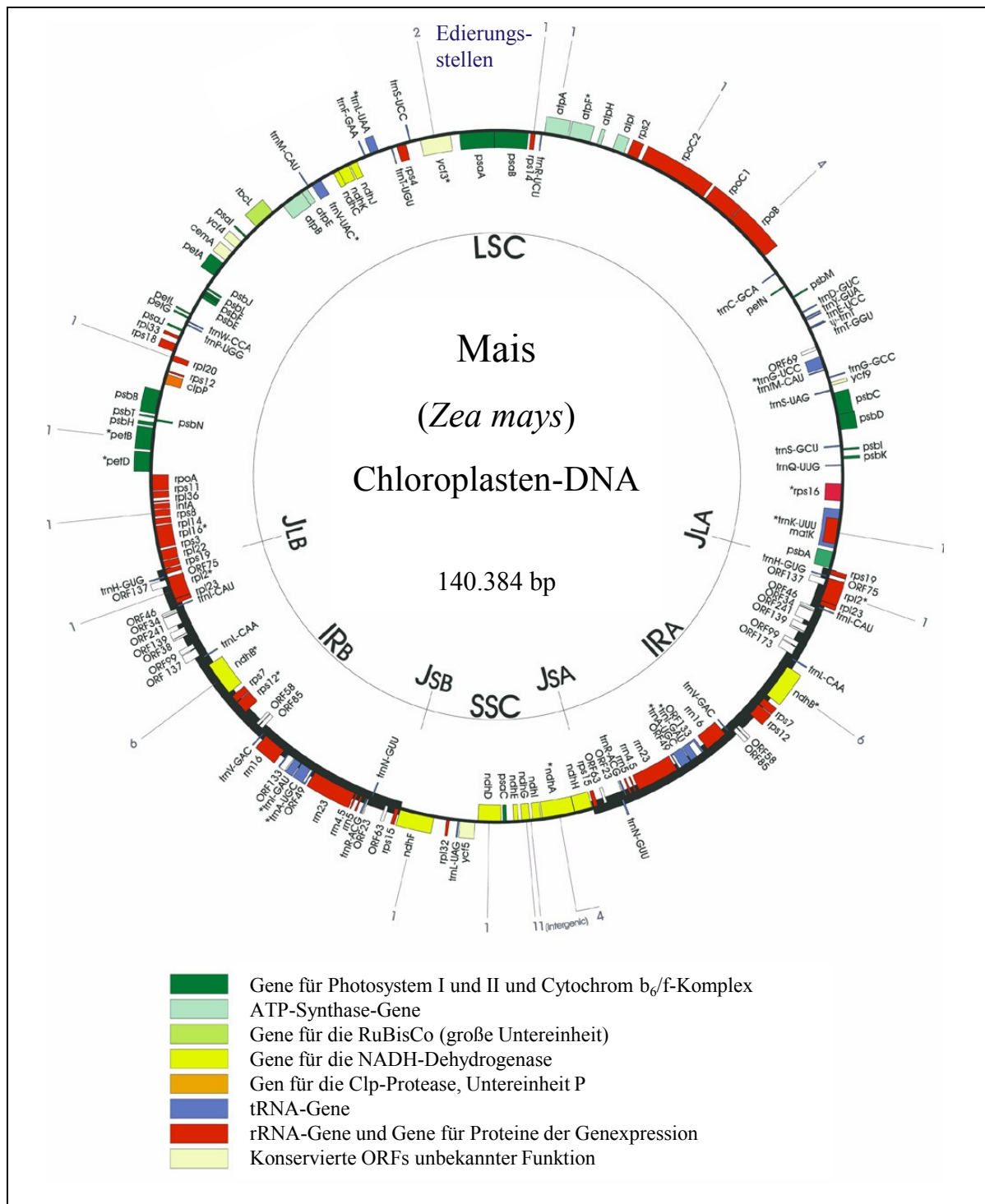


Abb. 1: Das Chloroplasten-Genom von *Zea mays* (nach Tillich *et al.*, 2001; Maier *et al.*, 1995)

Das Plastiden-Chromosom ist zirkulär dargestellt, die Gene auf dem äußeren Kreis werden dabei im Uhrzeigersinn transkribiert, die im inneren gegen den Uhrzeigersinn. Die farbigen Markierungen reflektieren die Funktion der kodierten Genprodukte. Enthalten Gene Introns, so ist dies durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Die blauen Zahlen außerhalb des Kreises geben die Anzahl der Edierungsstellen eines Gens an.

1.1.3 Der chloroplastidäre RNA-Metabolismus

Unter RNA-Metabolismus sind alle Prozesse zu verstehen, die die Herstellung, Modifikation und Umsetzung von RNA beinhalten, d. h. von der Transkription über die RNA-Prozessierung und die Translation bis zur RNA-Degradation (Anantharaman *et al.*, 2002). All diese Vorgänge sind notwendig zur Expression des genetischen Materials.

Ebenso wie die Biogenese und der Stoffwechsel eines Chloroplasten (siehe 1.1.1) zeugt auch die plastidäre Genexpression von seinem prokaryotischen Erbe. Wie oben erwähnt, weisen Plastiden ein eigenes Genom auf, welches transkribiert werden muss. Die Plastome fast aller Pflanzen kodieren Proteine für eine RNA-Polymerase (*plastid encoded plastid RNA polymerase*, PEP), die mit den Untereinheiten eubakterieller RNA-Polymerasen verwandt sind. Wie bei Cyanobakterien ist dabei das Gen *rpoC*, dessen Genprodukt die β' -Untereinheit darstellt, in zwei Gene, *rpoC1* und *rpoC2*, getrennt (Liere und Börner, 2007; Hess und Börner, 1999).

Doch wie Morden *et al.* an der parasitierenden Angiosperme *Epifagus virginiana* sowie Hess *et al.* an der *albostrians*-Mutante von *Hordeum vulgare* zeigen konnten, muss es ergänzend dazu eine nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase (NEP) geben (Morden *et al.*, 1991; Hess *et al.*, 1993). Es wurden, zunächst von Hedtke *et al.* in *Arabidopsis thaliana* (Hedtke *et al.*, 1997, 1999), später in zahlreichen weiteren Angiospermen (Chang *et al.*, 1999; Hedtke *et al.*, 2000, 2002; Kobayashi *et al.*, 2001, 2002; Emmanuel *et al.*, 2004; Kusumi *et al.*, 2004), Kandidatengene für solche NEP-Enzyme identifiziert, welche Homologie zu den Polymerasen der T3- und T7-Phagen aufweisen (Hedtke *et al.*, 1997; Liere und Börner, 2007). Gene für Phagentyp-Polymerasen sind sicherlich nicht durch den cyanobakteriellen Endosymbionten ins Kerngenom gelangt (Gray und Lang, 1998). Auch die Promotoren, die diese RNA-Polymerasen nutzen, unterscheiden sich deutlich von typisch eubakteriellen (Liere *et al.*, 2004; Swiatecka-Hagenbruch *et al.*, 2007). D. h., die Transkription in Chloroplasten ist entschieden komplexer als in den Ur-Ahnen der Plastiden.

Die Transkriptionsprodukte beider plastidärer RNA-Polymerasen sind in der Regel polycistronische RNAs, welche zur Reifung prozessiert werden (Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Endonukleasen spalten dabei die Transkripte vor der Translation zu kleineren, oft monocistronischen RNAs, ein Vorgang, der bei Bakterien nicht notwendig zu sein scheint (Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000; Maier *et al.*, 2008). Von Pfalz *et al.* wurde vorgeschlagen, dass endonukleolytisch gespaltene Transkripte sukzessive exonukleolytisch

abgebaut werden. Sekundärstrukturen in der RNA oder RNA-Bindeproteine definieren jene Sequenzbereiche, die vor dieser Degradation geschützt werden. Das spielt eine Rolle für einen geregelten RNA-Abbau bzw. andersherum die Stabilisierung von Transkripten. Außerdem werden auf diese Weise definierte 5'- und 3'-Termini generiert (Pfalz *et al.*, 2009). Die Prozessierung der 5'-Enden kann dabei entscheidend für die Translationseffizienz sein (Zusammenfassung in Bollenbach *et al.*, 2007). Insgesamt resultiert daraus ein komplexes Transkriptmuster mit variablen RNA-Spezies, wie es von Cyanobakterien nicht bekannt ist (Maier *et al.*, 2008).

Die Modifikation chloroplastidärer RNA beinhaltet zwei weitere Vorgänge, Spleißen und Edieren, welche evolutionäre Neuerwerbungen gegenüber dem prokaryotischen RNA-Metabolismus darstellen (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Spleißen bezeichnet das posttranskriptionelle Entfernen von Introns. Bei plastidären Introns werden aufgrund von Merkmalen ihrer Sequenz und der daraus abgeleiteten Sekundärstruktur Gruppe-I-, -II- oder -III-Introns unterschieden, wobei die letzteren aller Wahrscheinlichkeit nach degenerierte Gruppe-II-Introns darstellen. In den Plastomen von Landpflanzen findet man etwa 20 Gruppe-II- und ein Gruppe-I-Intron, deren Positionen streng konserviert sind. Sie sind offensichtlich frühzeitig in der Evolution der Pflanzen erworben worden (Michel *et al.*, 1989; Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Gruppe-I- und Gruppe-II-Introns konnten auch in Eubakterien, inklusive der Cyano- und Proteobakterien, detektiert werden (Ferat und Michel, 1993). So ist beispielsweise das plastidäre Gruppe-I-Intron im *trnL-UAA*-Gen auch in verschiedenen Cyanobakterien nachweisbar (Saldanha *et al.*, 1993). Nichtsdestotrotz sind solche Introns bedeutend häufiger in organellären Genomen, insbesondere in den Mitochondrien und Chloroplasten der Pflanzen, zu finden (Michel und Ferat, 1995; Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007).

Während des Spleißvorgangs finden in der Regel zwei Transester-Reaktionen statt. Durch einen nukleophilen Angriff wird zunächst die Exon-Intron-Bindung am ersten Exon gelöst, anschließend geht dieses eine neue Phosphordiester-Bindung mit dem zweiten Exon ein, das Intron fällt, bei Gruppe-II-Introns in einer Lariat-Struktur, heraus. Sowohl Gruppe-I- als auch Gruppe-II-Introns werden als Ribozyme bezeichnet, da für einzelne Vertreter *in vitro* die Befähigung zum autokatalytischen Spleißen beobachtet wurde. *In vivo* werden für eine effiziente Reaktion jedoch Spleißfaktoren benötigt (Saldanha *et al.*, 1993; zusammengefasst in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Nur ein potentieller Spleißfaktor wird in den Plastomen höherer Pflanzen kodiert: *matK* (Vogel *et al.*, 1999). Es gibt Hinweise, dass dieser

als Maturase zum Spleißen einer Untergruppe der Gruppe-II-Introns (Gruppe-IIA-Introns, Michel *et al.*, 1989) benötigt wird (Vogel *et al.*, 1997, 1999; Jenkins *et al.*, 1997; Zoschke *et al.*, 2010). Demgegenüber wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Kern-kodierten Proteinfaktoren identifiziert, welche zum Spleißen von einzelnen oder mehreren spezifischen plastidären Introns in Landpflanzen benötigt werden (u. a. Jenkins *et al.*, 1997; Till *et al.*, 2001; Ostheimer *et al.*, 2003; Meierhoff *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003; Ostersetzer *et al.*, 2005; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Asakura und Barkan, 2006, 2007). Der evolutionäre Ursprung dieser Proteine ist divers. Sie wurden im Rahmen der Koevolution von Wirt und Endosymbiont rekrutiert, um den neu erworbenen Ansprüchen der plastidären Genexpression zu genügen (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007).

Noch offensichtlicher als das Spleißen unterscheidet das Edieren den chloroplastidären RNA-Metabolismus von dem seiner bakteriellen Ahnen, es kommt in Prokaryoten nicht vor (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Der Prozessierungsschritt des RNA-Edierens führt zum hochspezifischen, posttranskriptionellen Umschreiben einzelner Nukleotide. Meist werden dabei Cytidine in Uracile desaminiert. Oft werden erst dadurch Kodons für konservierte Aminosäuren hergestellt (Tillich *et al.*, 2005, 2006a). In den Plastomen von Samenpflanzen sind etwa 30 bis 35 Edierungsstellen beschrieben (Tillich *et al.*, 2006a; Maier *et al.*, 2008). Obwohl diese Anzahl sehr konstant ist, variieren die spezifischen Stellen zwischen verschiedenen Spezies stark. Selbst zwischen nah verwandten Arten gibt es Unterschiede, was zu der Schlussfolgerung führte, dass plastidäre Edierungsstellen sehr rasch evolvieren (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001, 2002; Tillich *et al.*, 2006b). In der direkten Sequenzumgebung des zu edierenden Nukleotids sind *cis*-Elemente beschrieben, welche der Erkennung durch Kern-kodierte *trans*-Faktoren dienen (Übersicht in Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007).

Der obige Abschnitt veranschaulicht, dass der chloroplastidäre RNA-Metabolismus weitaus komplexer ist als der prokaryotische. Damit Transkripte korrekt translatiert werden können bzw. damit tRNAs und rRNAs funktionell sind, müssen sie aufwändig zurechtgeschnitten, stabilisiert, gespleißt und ediert werden (Abb. 2). Diese Komplexität entstand erst nach der Endosymbiose und erfordert eine Vielzahl nukleär kodierter Proteinfaktoren, die mit plastidärer RNA interagieren (Maier *et al.*, 2008; Nickelsen, 2003a). Eine außerordentlich große Gruppe von organellär lokalisierten RNA-Bindeproteinen sind die PPR-Proteine (Small und Peeters, 2000).

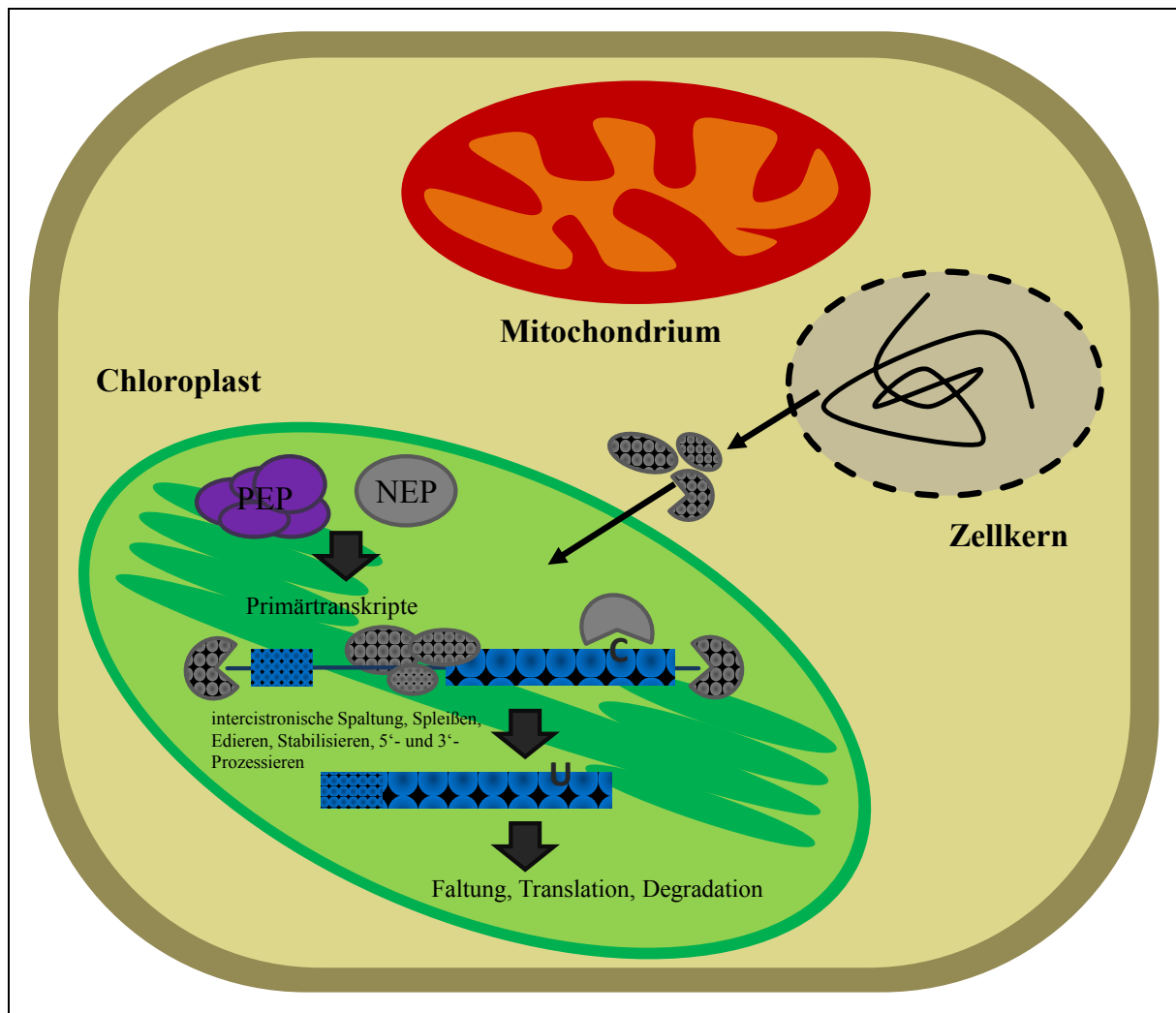


Abb. 2: Die Komplexität des chloroplastidären RNA-Metabolismus

Schematische Darstellung der plastidären Genexpression, insbesondere der RNA-Prozessierungsschritte: Primärtranskripte werden endo- und exonukleolytisch gespalten und müssen ediert, gespleißt und stabilisiert werden. Das erfordert eine Vielzahl nukleär kodierter Proteine (dargestellt in grau), die aus dem Zytoplasma importiert werden. Auch für die Translation und RNA-Degradation werden Kern-kodierte Faktoren benötigt.

1.2 PPR-Proteine

Interessanterweise blieben die *pentatricopeptide repeat* (PPR) Proteine bis zu ihrer Beschreibung durch Small und Peeters vor zehn Jahren als Proteinfamilie unentdeckt, obgleich sie mit mehreren Hundert Vertretern in Angiospermen die größte Gruppe RNA-bindender Proteine in Pflanzen bilden (Small und Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). Einzelne PPR-Gene waren mit *pet309* in Hefe, *cya-5* in *Neurospora crassa* und *crp1* in Mais zu diesem Zeitpunkt bereits

beschrieben. Sie alle kodieren Proteine, denen Funktionen in der Modifikation bzw. Translation definierter, organellärer Ziel-RNAs zugewiesen werden (Manthey und McEwen, 1995; Coffin *et al.*, 1997; Fisk *et al.*, 1999). Doch erst durch die vollständige Sequenzierung des Kerngenoms von *Arabidopsis thaliana* wurden PPR-Gene als große, Pflanzen-spezifische Familie offenbar, und PPR-Proteine traten in den Fokus der Analyse des chloroplastidären und mitochondrialen RNA-Metabolismus der Pflanzen (Small und Peeters, 2000; Aubourg *et al.*, 2000; Lurin *et al.*, 2004).

1.2.1 Das Pentatricopeptid-Motiv und die Struktur von PPR-Proteinen

PPR-Proteine sind charakterisiert durch ein degeneriertes Motiv von 35 Aminosäuren, welches in bis zu 30 direkten Wiederholungen vorliegt. Die Benennung erfolgte in Analogie zu den zuvor definierten TPR-Proteinen (*tetratricopeptide repeat*), beide werden der Gruppe der α -Solenoid-Proteine zugeordnet (Small und Peeters, 2000; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Das Kennzeichen dieser *repeat*-Proteine ist die wiederholte Abfolge eines definierten Strukturmotivs, was zu einer Gesamtstruktur führt, die aufgrund ihrer großen Oberfläche als Interaktionsplattform fungiert. Gemäß Strukturvorhersagen und bestätigt durch Kristallstrukturanalysen bilden in TPR-Proteinen mehrere Paare antiparalleler α -Helices eine Superhelix, deren konkave Innenseite Proteine bindet (Blatch und Lässle, 1999; Wilson *et al.*, 2005). Ähnlich sollen auch PPR-Motive je zwei α -Helices A und B formen, die in ihren Wiederholungen eine Superhelix kreieren. Ein Unterschied zu den TRP-Motiven besteht unter anderem darin, dass die nach innen weisenden Aminosäurereste der Helix A ausschließlich hydrophil zu sein scheinen, sodass der von der PPR-Superhelix eingeschlossene Innenraum, Vorhersagen zufolge, eine positiv geladene Seite enthält. Durch die vergleichsweise hohe Anzahl ihrer PPR-Motive bieten PPR-Proteine Platz für größere Liganden. So wurde anstelle einer Interaktion mit Proteinen eine Assoziation mit RNA vorgeschlagen (Small und Peeters, 2000). Derzeit gibt es keine experimentellen Strukturinformationen, doch es wird angenommen, dass die spezifische RNA-Bindung ähnlich wie bei Puf-Domänen-Proteinen erfolgt, die ebenfalls den α -Solenoid-Proteinen angehören und durch ein wiederholtes Motiv von drei Helices charakterisiert sind (Edwards *et al.*, 2001b; Delannoy *et al.*, 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

Von Lurin *et al.* wurde beobachtet, dass nur etwa die Hälfte der PPR-Proteine in *Arabidopsis thaliana* das oben beschriebene PPR-Motiv in mehreren direkten Wiederholungen zeigt. Die anderen Proteine weisen neben diesem Konsensus-Motiv zwei davon abgeleitete Motive auf:

ein kürzeres von 31 Aminosäuren (genannt S für *short*) und ein längeres von zumeist 36 Aminosäuren (L für *long*). Diese Sequenzmotive sind in der Regel als P-L-S Triplets organisiert, wobei P das klassische PPR-Motiv symbolisiert. Entsprechend werden bei PPR-Proteinen P-Typ- und PLS-Typ-Proteine unterschieden (Lurin *et al.*, 2004; Abb. 3). Letztere überlappen weitgehend mit den parallel und unabhängig zu den PPR-Proteinen beschriebenen *plant combinatorial and modular proteins* (PCMP, Aubourg *et al.*, 2000; Rivals *et al.*, 2006).

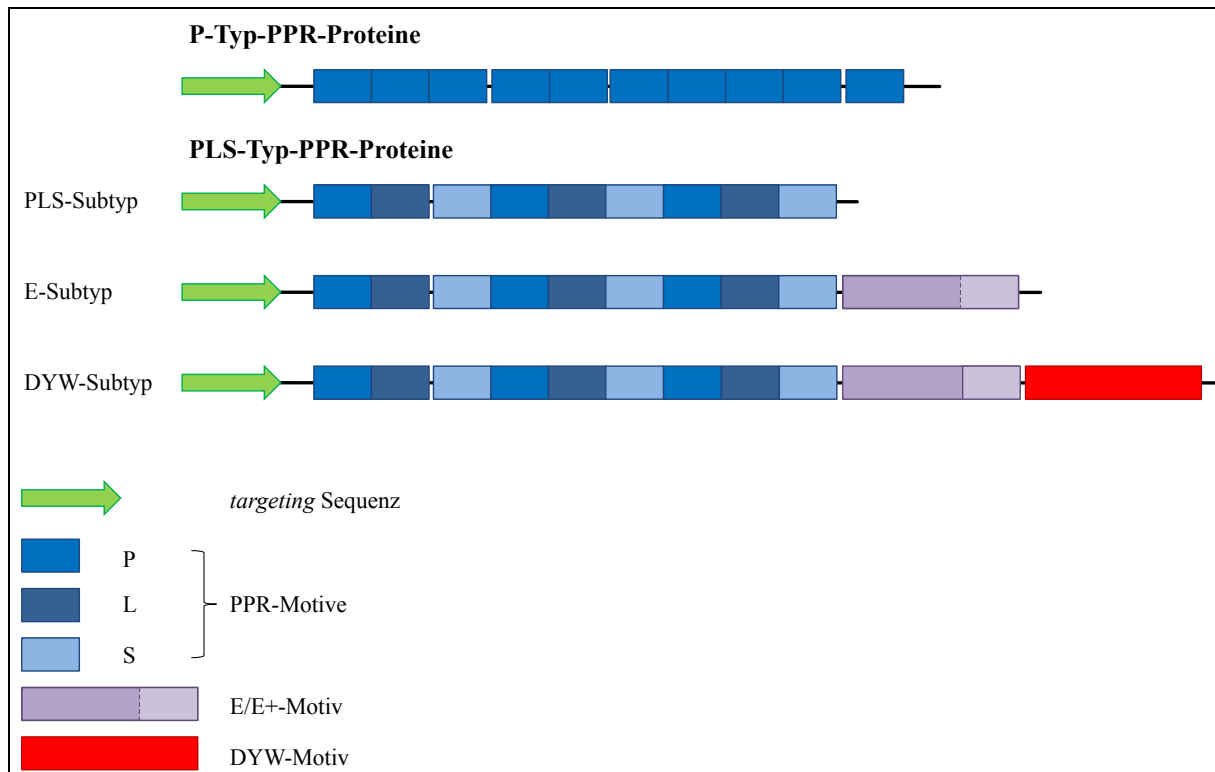


Abb. 3: Schematische Darstellung der Motive in PPR-Proteinen (nach Lurin *et al.*, 2004; Schmitz-Linneweber und Small, 2008)

PPR-Proteine des P-Typs enthalten in direkten Wiederholungen das klassische PPR-P-Motiv. In PLS-PPR-Proteinen ist dieses im Wechsel mit den L- und S-Motiven vorhanden. Die dunkelblaue Linie symbolisiert Sequenzabschnitte, die zwischen den PPR-Abschnitten vorhanden sein können, nicht immer schließt sich ein PPR-Motiv nahtlos an das vorherige an. Der N-Terminus vieler PPR-Proteine weist organelläre Transitsequenzen auf. C-terminal von den PPR-Motiven können in PLS-Proteinen weitere charakteristische Domänen vorkommen.

Zusätzlich zu den genannten PPR-Motiven weisen viele PPR-Proteine vor oder nach der Folge von PPRs weitere Sequenzabschnitte auf (Abb. 3). Im N-terminalen Bereich der Proteine sind in der Regel organelläre *targeting* Sequenzen nachzuweisen (Lurin *et al.*, 2004). Innerhalb der PLS-Subfamilie kommen zwei charakteristische Zusatzdomänen C-terminal der

PPR-Motive vor. Einige Proteine enthalten die E-Domäne (für *extended*), welche ursprünglich unterteilt wurde in zwei kleinere Motive E und E+. Da keine funktionellen Unterschiede zwischen diesen beiden Bereichen determiniert werden konnten und ein E+-Abschnitt nur auf einen E-Bereich folgend vorkommt, werden die Motive in der neueren Literatur zusammengefasst (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Die zweite Zusatzdomäne wird durch ein C-terminales Asparaginsäure-Tyrosin-Tryptophan-Tripeptid definiert und entsprechend mit DYW bezeichnet. Dieses Motiv schließt sich an das E-Motiv an. Die E- und DYW-Sequenzen zeigen keine Ähnlichkeit zu den PPR-Motiven, ihre Herkunft ist noch völlig unklar (Lurin *et al.*, 2004). Es können weitere Domänen in PPR-Proteinen vorkommen, beispielsweise die RRM-Domäne (*RNA recognition motif*) im PPR4-Protein (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006) oder die vermutlich DNA-bindenden SMR-Domänen (*small mutS related*, Koussevitzky *et al.*, 2007). Domänen, denen eine katalytische Funktion zugeschrieben werden kann, enthält die Mehrheit der PPR-Proteine jedoch nicht, weshalb sie als Adaptoren angesehen werden, die RNA-prozessierende Enzyme zu spezifischen Ziel-RNAs leiten (Lurin *et al.*, 2004; Schmitz-Linneweber und Small, 2008).

1.2.2 Verbreitung und Evolution von PPR-Proteinen

Mit der Erstbeschreibung der PPR-Gene ging die Erkenntnis einher, dass es sich um eine Pflanzen-spezifische Genfamilie handelt (Small und Peeters, 2000). Denn obwohl die PPR-Gene innerhalb der Eukaryoten weit verbreitet sind, variiert ihre Anzahl in verschiedenen Taxa beträchtlich (Lurin *et al.*, 2004; siehe Abb. 4). Die in Angiospermen wie *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* nachgewiesene Abundanz der Gene (450 respektive 477, O'Toole *et al.*, 2008) scheint auf Landpflanzen beschränkt zu sein. In den Genomen von Hefen, Tieren und sogar Algen werden nur zwei bis elf PPR-Gene kodiert (Lurin *et al.*, 2004; Schmitz-Linneweber und Small, 2008; Johnson *et al.*, 2010). Außerhalb des Pflanzenreiches weist *Trypanosoma brucei* mit 28 identifizierten PPR-Motive enthaltenden Sequenzen noch verhältnismäßig viele PPR-Gene auf (Pusnik *et al.*, 2007). In *Giardia*, die degenerierte Mitochondrien ohne ein Genom besitzen (Dolezal *et al.*, 2005), fehlen PPR-Proteine (Andrés *et al.*, 2007). Von den oben beschriebenen PPR-Gen-Subfamilien kommen die P-Typ-Gene ubiquitär in Eukaryoten vor, Gene des PLS-Typs sind nur in Landpflanzen kodiert (Lurin *et al.*, 2004; Andrés *et al.*, 2007).

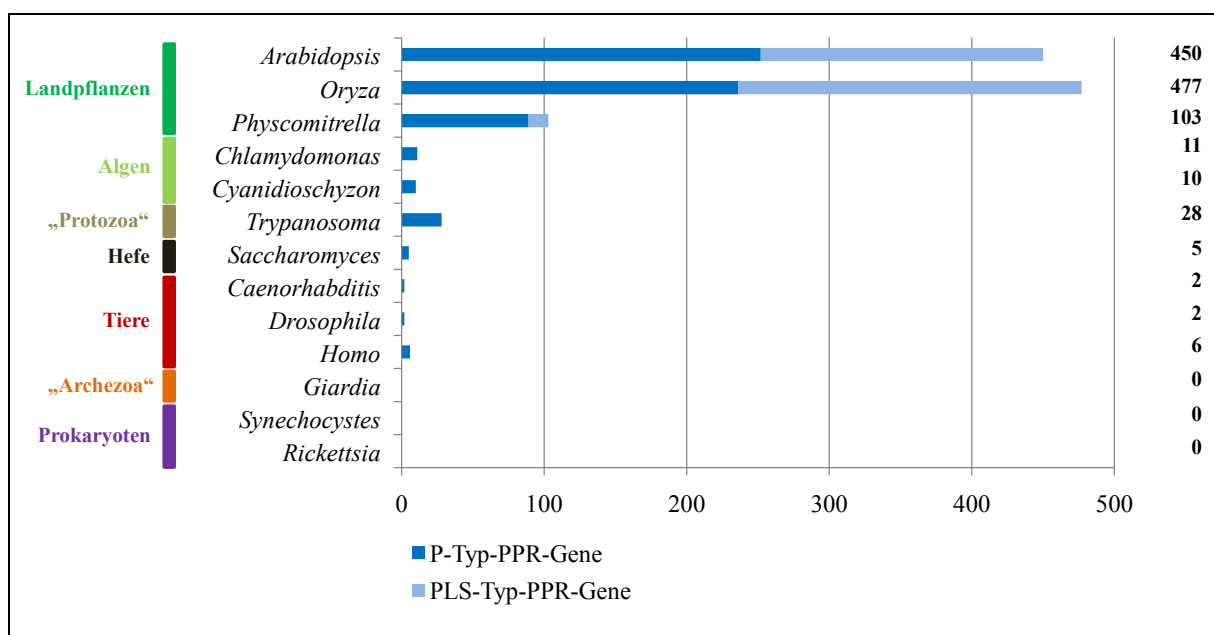


Abb. 4: Verteilung von PPR-Genen (nach Schmitz-Linneweber und Small, 2008)

Dargestellt ist die Anzahl der PPR-Gene in Prokaryoten und Eukaryoten. Die Daten entstammen den Arbeiten von Lurin *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2008; Schmitz-Linneweber und Small, 2008 sowie Johnson *et al.*, 2010 (für *Chlamydomonas reinhardtii*); Andrés *et al.*, 2007 (für *Giardia*) und Pusnik *et al.*, 2007 (für *Trypanosoma brucei*). Die blauen Balken geben die Verteilung auf P- und PLS-Typ-Genen wieder. Letztere sind nur in Landpflanzen identifiziert worden. Die fettgedruckten Zahlen rechts geben die absolute Anzahl der PPR-Gene an.

Aufschluss über die Expansion der PPR-Proteine in Pflanzen gibt das Laubmoos *Physcomitrella patens*, dessen Genom 103 PPR-Gene kodiert (O'Toole *et al.*, 2008), während das der Farnverwandten *Selaginella moellendorffii* nach ersten Untersuchungen über 600 PPR-Gene aufweist (Yuan *et al.*, 2009). Diese Zahlen legen nahe, dass es erst nach der Trennung von Moosen und Gefäßpflanzen zu einer immensen Vermehrung der PPR-Gene kam (O'Toole *et al.*, 2008).

Die eudikotyle Pflanze *Arabidopsis thaliana* und die Monokotyle *Oryza sativa* verfügen nicht nur über praktisch gleich viele PPR-Gene, auch die Verteilung der Gene auf die einzelnen Subtypen (P-, PLS-, E- und DYW-Gene) ist nahezu identisch. Darüber hinaus zeigt eine Stammbaumrekonstruktion mit allen *Arabidopsis*- und Reis-Sequenzen, dass die meisten PPR-Gene als Orthologe in beiden Spezies existieren. Duplikationen bzw. Genverluste innerhalb nur einer Art sind selten (Abb. 5; Begriffsklärung Orthologie/Paralogie siehe Anhang 1). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine massive Amplifikation der PPR-Gene vor der Trennung von Monokotylen und Eudikotylen stattfand bzw. mit dieser koinzidiert (O'Toole *et al.*, 2008). Ob sich diese Expansion schon früh innerhalb der Gefäßpflanzen ereignete und

die *Selaginella*-PPR-Gene Orthologe der Angiospermen-Gene sind, bleibt noch zu untersuchen.

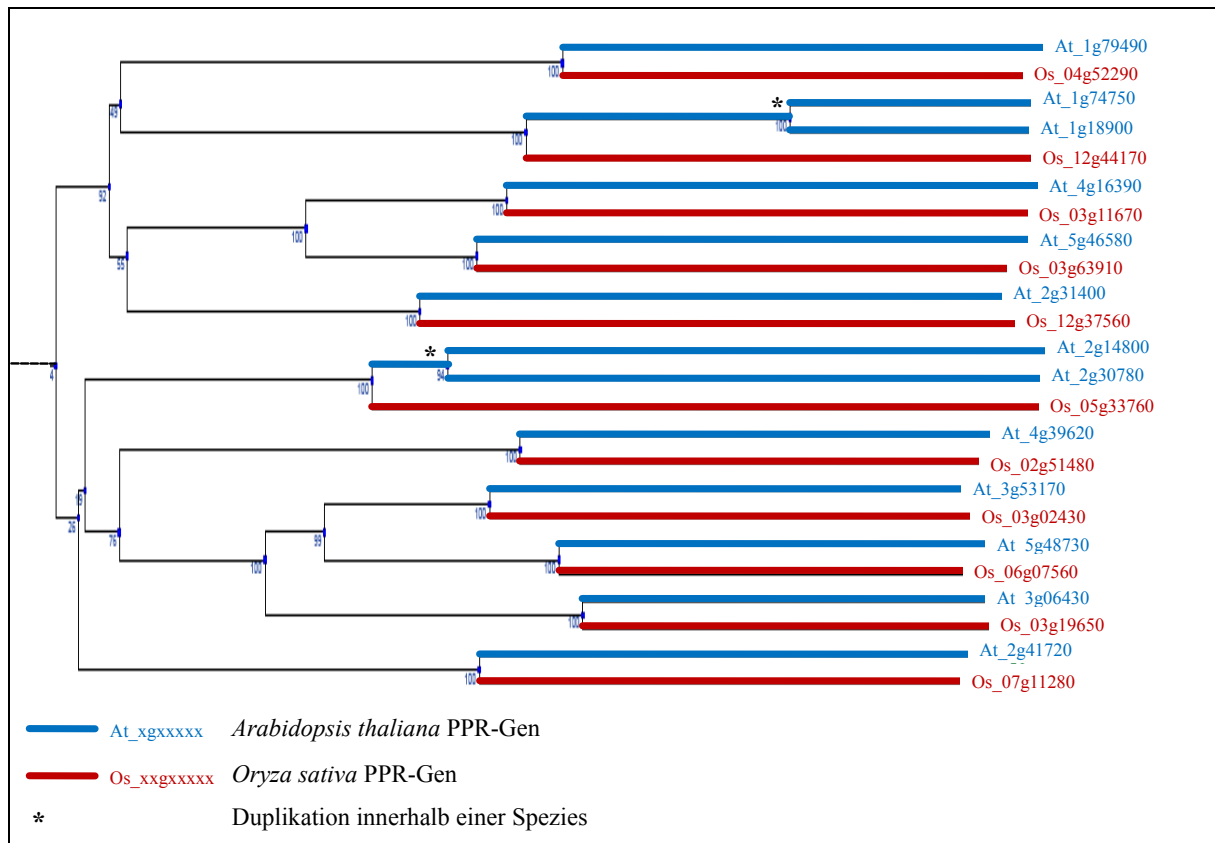


Abb. 5: Orthologe PPR-Gene in *Arabidopsis* und Reis (nach Daten von Small *et al.*, nicht publiziert)

Gezeigt ist ein beispielhafter Ausschnitt einer Stammbaumrekonstruktion der PPR-Gene von *Arabidopsis thaliana* (blaue Kennzeichnung) und *Oryza sativa* (rot). Die Mehrheit der PPR-Gene hat Orthologe in beiden Spezies. Genduplikationen nach der evolutionären Auftrennung mono- und eudikotiler Pflanzen sind die Ausnahme (gekennzeichnet durch *). Die Expansion der PPR-Gene in Landpflanzen erfolgte demnach vor der Trennung von Monokotylen und Eudikotylen (O'Toole *et al.*, 2008).

Die Analyse der Exon-Intron-Struktur der PPR-Gene gibt Hinweise auf den Mechanismus, der dem sprunghaften Anstieg der Gen-Familie in Landpflanzen zugrunde liegt. Die überwiegende Mehrheit der PPR-Gene in *Arabidopsis* und Reis enthält keine Introns. Die Gene mit einem oder wenigen Introns weisen diese zumeist im 5'-Bereich ihrer Sequenz auf. Das impliziert durch Retrotransposition vermittelte Genduplikationen (Lurin *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2008). Die wenigen Intron-reichen Gene repräsentieren dabei ursprünglichere Gene, aus deren gespleißten mRNAs die Intron-ärmeren durch reverse Transkription und homologe Rekombination entstanden (O'Toole *et al.*, 2008). Im Einklang damit steht die Tatsache, dass

die PPR-Gene in *Physcomitrella*, welche eher Intron-reich sind, gemäß phylogenetischen Untersuchungen zumeist mit den mehrere Introns enthaltenden, also ursprünglicheren, PPR-Genen in Angiospermen in nächster Verwandtschaft stehen. Doch auch *Physcomitrella* weist im Vergleich zu anderen Eukaryoten zahlreiche PPR-Gene auf, einige davon ebenfalls mit wenigen bzw. ohne Introns. So fand eine erste, wahrscheinlich durch reverse Transkription vermittelte Expansion bereits vor der Divergenz von Laubmoosen und Gefäßpflanzen statt. Innerhalb der Moose erfolgten unabhängig weitere Genduplikationen, erkennbar daran, dass 42 der 103 PPR-Gene paraloge Paare in *Physcomitrella* bilden (O'Toole *et al.*, 2008).

Sehr viel weniger verstanden als die Expansion der PPR-Proteine in Pflanzen ist ihr evolutionärer Ursprung insgesamt. Die weite Verbreitung ebenso wie ihre Funktion in den Organellen ließen einen mitochondrialen oder chloroplastidären Ursprung plausibel erscheinen, doch weder organelläre Genome noch die rezenter Verwandter der Endosymbionten kodieren PPR-Motive. Sie traten nach derzeitigem Kenntnisstand erstmals in Eukaryoten auf, denn die wenigen in Prokaryoten identifizierten PPR-Sequenzen sind aller Wahrscheinlichkeit nach durch horizontalen Gentransfer in diese Organismen gelangt (Lurin *et al.*, 2004; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Möglicherweise von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass die strukturell sehr ähnlichen TPR-Proteine in Prokaryoten, ebenso wie in Eukaryoten, weit verbreitet sind (Blatch und Lässle, 1999; D'Andrea und Regan, 2003). Selbst in Organellen-Genomen, z. B. im plastidär kodierten Gen *ycf3*, treten TPR-Motive auf (Boudreau *et al.*, 1997). Interessanterweise ist der Innenraum der Helix einiger TPR-Proteine gerade so gestaltet, dass sie nicht mit Proteinen, sondern mit RNA interagieren (D'Andrea und Regan, 2003; Sane *et al.*, 2005).

1.2.3 Die Funktion von PPR-Proteinen im organellären RNA-Metabolismus

Die Mehrheit der PPR-Proteine enthält N-terminale Sequenzabschnitte, die gemäß *in silico*-Analysen eine Lokalisation in den Mitochondrien oder Chloroplasten vermitteln (Lurin *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2008; siehe Abb. 6). Für ungefähr ein Viertel der PPR-Proteine von *Arabidopsis thaliana* konnte kein organelläres *targeting* vorhergesagt werden (Lurin *et al.*, 2004), wobei hier die Rate von ca. 20 bis 30% falsch-negativen Prognosen durch die Analyseprogramme zu berücksichtigen ist (Small *et al.*, 2004). Tatsächlich zeigen *in vitro-targeting*-Experimente auch für viele Proteine ohne Lokalisationsvorhersage einen Import in die Organellen (L. Heurtevin und C. Lurin, persönliche Mitteilung). Fast alle derzeit funktionell

charakterisierten PPR-Proteine bestätigen eine Funktion in den Mitochondrien und Chloroplasten (Delannoy *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Eine Ausnahme könnte ein von Ding *et al.* analysiertes PPR-Protein bilden, welches möglicherweise im Nukleus von *A. thaliana* als Transkriptionsfaktor mit der RNA-Polymerase II interagiert (Ding *et al.*, 2006).

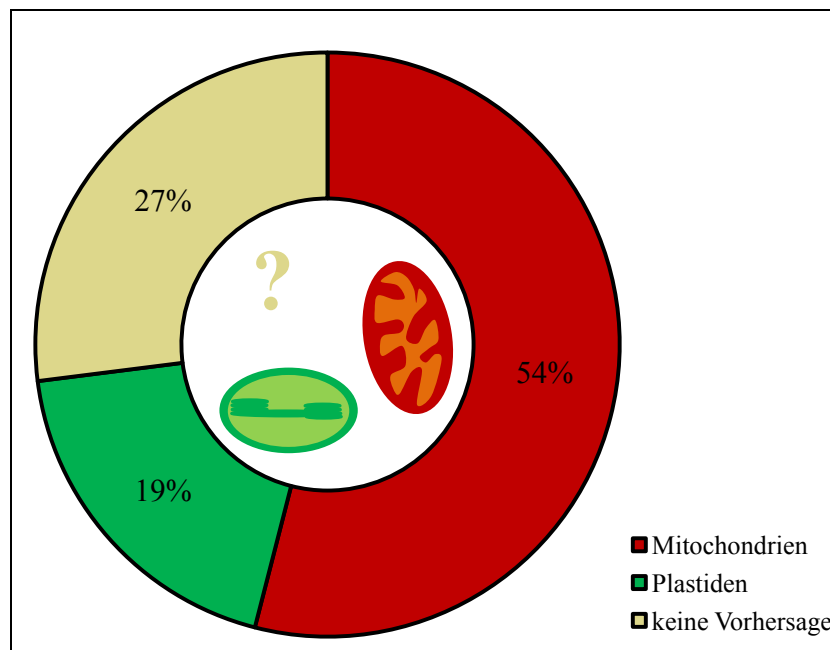


Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation von PPR-Proteinen in *Arabidopsis thaliana* (nach Lurin *et al.*, 2004)

Gemäß *targeting*-Vorhersagen ist die Mehrheit der PPR-Proteine in *Arabidopsis* in den Mitochondrien oder Plastiden lokalisiert.

Wie unter 1.2.2 dargelegt, zeigt die Familie der PPR-Gene eine bemerkenswerte Konservierung innerhalb der Angiospermen, was für eine essentielle, nicht-redundante Funktion der kodierten Proteine – trotz ihrer großen Anzahl – spricht (Lurin *et al.*, 2004; O'Toole *et al.*, 2008). Gestützt wird dies durch Mutantenanalysen. Homozygote Mutationen in einzelnen PPR-Genen haben oftmals starke phänotypische Auswirkungen bis hin zu Embryoletalität (Lurin *et al.*, 2004; Cushing *et al.*, 2005; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Genetische Analysen der PPR-Gen-Mutanten zeigen Defekte in der Prozessierung oder Translation organellärer RNAs, wobei jeweils spezifische Transkripte betroffen zu sein scheinen (Übersichten in Delannoy *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). In einigen wenigen Fällen wurden RNA-Liganden eines PPR-Proteins *in vivo* durch

Immunopräzipitation und eine nachfolgende Analyse der gebundenen RNA (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b, 2006) oder *in vitro* (Nakamura *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 2006; Kazama *et al.*, 2008) bestimmt. Diese Analysen zeigen, dass PPR-Proteine hochspezifisch mit definierten Transkripten interagieren können. Wie die genaue Erkennung jedoch funktioniert, ist unklar, da bisher weder übereinstimmende Struktur- noch Sequenzmotive identifiziert werden konnten (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Zwar wurde für das Mais-Protein CRP1 ein putatives Erkennungsmotiv bestehend aus zwei durch exakt 51 Nukleotide getrennten, kurzen Sequenzen ermittelt, das beide Ziel-RNAs streng konserviert aufweisen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b). Für CLB19, CRR22 und CRR28, die ebenfalls je mehrere RNA-Liganden binden sollen, scheinen solche Erkennungssequenzen jedoch nicht zu existieren (Chateigner-Boutin *et al.*, 2008; Okuda *et al.*, 2009). Allerdings gibt es erste Hinweise, dass es die PPR-Motive selbst sind, und nicht weitere Domänen, die die RNA-Liganden binden. So konnten Okuda *et al.* für zwei E-Typ-PLS-Proteine in Mutanten-Komplementationsanalysen zeigen, dass ein Austausch der E-Domänen die Spezifität der Interaktion erhält und diese demnach durch den PPR-Bereich des Proteins definiert wird (Okuda *et al.*, 2007). In Hefe wurde für sieben PPR-Motive des PET309-Proteins nachgewiesen, dass jedes einzelne davon notwendig für die Funktion des Proteins in der Translation der *coxI*-mRNA ist. Nach Spekulation der Autoren ist somit jedes PPR-Motiv essentiell für eine hochaffine RNA-Bindung (Tavares-Carreón *et al.*, 2008).

D. h., PPR-Proteine sind Transkript-spezifische, organelläre RNA-Bindeproteine und als solche ideale Kandidaten für die zahlreichen Kern-kodierten Faktoren, die für den komplexen plastidären RNA-Metabolismus benötigt werden (Maier *et al.*, 2008). Tatsächlich wurde PPR-Proteinen bereits ein bemerkenswert breites Spektrum posttranskriptioneller Prozessierungsschritte zugeschrieben. Das *Arabidopsis*-PPR-Protein PGR3 stabilisiert Transkripte des *petL*-Operons (Yamazaki *et al.*, 2004). CRP1 in Mais sowie HCF152 und das DYW-PPR-Protein CRR2 in *Arabidopsis* sind für intergenische Prozessierungen spezifischer RNAs notwendig (Fisk *et al.*, 1999; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b; Meierhoff *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2003). Möglicherweise haben CRP1 und HCF152 dabei, wie es für das Mais-Protein PPR10 beschrieben wurde, eher eine Funktion in der Stabilisierung generierter 5'- bzw. 3'-Transkripttermini ihrer Ziel-RNAs als in deren endonukleolytischer Spaltung (Pfalz *et al.*, 2009). CRP1 aktiviert darüber hinaus die Translation der *petA*- und der *psaC*-RNA (Fisk *et al.*, 1999; Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b). Zudem sind PPR-Proteine als Spleißfaktoren identifiziert worden. In Chloroplasten von Mais ist PPR4 essentiell für das Spleißen des *rps12-trans*-

Introns (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006). Weitere plastidäre Spleißfaktoren wurden z. B. mit OTP51 und HCF152 in *Arabidopsis* und mit PPR531-11 in *Physcomitrella* beschrieben (Falcon de Longevialle *et al.*, 2008; Meierhoff *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2007).

Bereits seit ihrer Charakterisierung wird vermutet, dass PPR-Proteine in den Organellen von Pflanzen am hochspezifischen Edieren beteiligt sind (Small und Peeters, 2000). Nach der Identifikation des PPR-Proteins CRR4 als plastidärem Edierungsfaktor (Kotera *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2006) wurden inzwischen mehrere weitere beschrieben, welche alle E- oder DYW-Proteine sind (Okuda *et al.*, 2007, 2008, 2009, 2010; Chateigner-Boutin *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2009; Hammani *et al.*, 2009). Das Vorkommen von Edierungsstellen korreliert phylogenetisch strikt mit dem Vorhandensein von DYW-Motiven in Proteinen der Landpflanzen (Salone *et al.*, 2007; Rüdinger *et al.*, 2008). Außerdem weisen DYW-Domänen streng konservierte Cystidine und Histidine auf und zeigen Ähnlichkeit zu Cytidin-Desaminasen. Daraufhin wurde vorgeschlagen, dass die DYW-Domänen Edierungsaktivität besitzen (Salone *et al.*, 2007). Einige charakterisierte Edierungsfaktoren enthalten selbst jedoch kein DYW-Motiv (Kotera *et al.*, 2005; Okuda *et al.*, 2007, 2008; Chateigner-Boutin *et al.*, 2008). In den DYW-PPR-Proteinen CRR22, CRR28 und OTP82 scheint die DYW-Domäne für die Edierung entbehrlich, demgegenüber ist die E-Domäne in mehreren DYW- und E-Typ-Proteinen essentiell. Es wird angenommen, dass die E-Domäne die Funktion hat, ein bisher unbekanntes Edierungsenzym zu rekrutieren (Okuda *et al.*, 2007, 2009, 2010). Sollten DYW-Domänen diese Aktivität bereitstellen, müssten sie auch in *trans* wirken können (Okuda *et al.*, 2009). Einige DYW-Proteine, z. B. das oben angesprochene CRR2, werden mit endonukleolytischer Spaltung assoziiert – die DYW-Domäne ist dafür nachweislich notwendig – und nicht mit Edierung (Hashimoto *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 2009; Nakamura und Sugita, 2008). Denkbar wäre, da ein direkter Zusammenhang zwischen Ribonukleolyse und Desaminierung nicht bekannt ist, dass einige DYW-Domänen edierende Aktivität besitzen, andere endonukleolytische. Zusätzliche Kofaktoren könnten dabei modulieren, ob sie RNA binden oder als Ribonukleasen wirken (Okuda *et al.*, 2009). Insgesamt wird davon ausgegangen, dass PPR-Proteine in Komplexen vorkommen und insbesondere PPR-Proteine ohne DYW-Domäne mit Partnerproteinen mit katalytischer Aktivität zusammenwirken (Lurin *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit ist vorrangig der chloroplastidäre RNA-Metabolismus von Interesse, es soll jedoch erwähnt werden, dass in Mitochondrien, ebenso wie in Plastiden, PPR-Proteine am posttranskriptionellen RNA-Spleißen (Falcon de Longevialle *et al.*, 2007),

Edieren (Zehrmann *et al.*, 2009; Verbitskiy *et al.*, 2010; Takenaka, 2010; Tasaki *et al.*, 2010; Doniwa *et al.*, 2010), Stabilisieren (Mancebo *et al.*, 2001) sowie an der Translation (Manthey und McEwen, 1995; Coffin *et al.*, 1997; Uyttewaal *et al.*, 2007; Tavares-Carreón *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2009) beteiligt sind. Darüber hinaus sind zahlreiche PPR-Gene in diversen Spezies im Zusammenhang mit der Analyse zytoplasmatischer männlicher Sterilität (CMS) als Rf-Gene (*restorer of fertility*) identifiziert worden (u. a. Bentolila *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2003; Desloire *et al.*, 2003; Koizuka *et al.*, 2003; Kazama und Toriyama, 2003; Akagi *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009). CMS bezeichnet die Unterdrückung der Pollenherstellung durch die Expression anormaler mitochondrialer offener Leserahmen (ORFs). Kern-kodierte Rf-Faktoren stellen die männliche Fruchtbarkeit wieder her, indem die Expression dieser ORFs verhindert wird (Schnable und Wise, 1998). Mechanismen, durch die dies ermöglicht wird, sind die endonukleolytische Spaltung aberranter Transkripte (Akagi *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006), die Degradation der RNA (Wang *et al.*, 2006) oder die Inhibition ihrer Translation (Brown *et al.*, 2003; Koizuka *et al.*, 2003; Übersicht in Chase, 2007). Rf-PPR-Gene scheinen rasch zu evolvieren, Duplikationen innerhalb einer Art führen zu Chromosomen-Regionen mit mehreren paralogen PPR-Genen (Bentolila *et al.*, 2002; Desloire *et al.*, 2003; Geddy und Brown, 2007; Xu *et al.*, 2009). Tatsächlich handelt es sich bei den beiden Art-spezifischen, paralogen PPR-Gen-Verwandtschaftsgruppen innerhalb des Stammbaums der PPR-Gene von *Arabidopsis* und Reis um Homologe der Rf-Gene (O'Toole *et al.*, 2008).

Somit ist inzwischen anerkannt, dass PPR-Proteine eine tragende Rolle im organellären RNA-Metabolismus spielen. Nichtsdestotrotz gibt es kaum biochemische Daten zur Funktion von PPR-Proteinen und von der Vielzahl pflanzlicher PPR-Proteine ist noch immer nur ein kleiner Teil untersucht worden (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Weiterhin stellt sich die Frage, warum der organelläre RNA-Metabolismus diese Komplexität aufweist und Pflanzen so viele PPR-Proteine benötigen. Innerhalb der Zelle müssen Kern- und Organellengenome koordiniert exprimiert werden, um Genprodukte aus verschiedenen Kompartimenten in stöchiometrischen Verhältnissen zu akkumulieren (Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000). Das in den Plastiden lokalisierte PPR-Protein GUN1 scheint ein Element des retrograden Signalwegs vom Plastid zum Kern zu sein (Koussevitzky *et al.*, 2007). Dieser Signalweg dient dazu, die nukleäre Genexpression mit der Funktion der Chloroplasten zu koordinieren. Andersherum muss die chloroplastidäre Genexpression durch den Kern kontrollierbar sein. Es gibt Hinweise, dass dies maßgeblich durch die Stabilität und Prozessierung sowie schließlich

die Translation der plastidären RNA geschieht (Nickelsen, 2003b; Bollenbach *et al.*, 2007; del Campo, 2009). Insofern könnten die PPR-Proteine als RNA-bindende Faktoren eine Schlüsselfunktion in der Gen-spezifischen Regulation der organellären Genexpression einnehmen (Delannoy *et al.*, 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* konnte gezeigt werden, dass das PPR-Protein MCA1, welches für die Stabilität des plastidären *petA*-Transkripts benötigt wird, in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen exprimiert wird und so die Akkumulation des Cytochrom f reguliert wird (Raynaud *et al.*, 2007). Weitere Belege für eine regulative Funktion von PPR-Proteinen fehlen jedoch (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Tatsächlich scheinen PPR-Proteine im Allgemeinen konstitutiv exprimiert zu werden (Lurin *et al.*, 2004). So schlagen Maier *et al.* vor, dass sich die Komplexität des organellären RNA-Metabolismus nicht so sehr aufgrund einer Notwendigkeit von Regulationsmechanismen manifestiert hat, sondern vielmehr das Resultat von Mutationen im Organellengenom ist, die durch das schneller evolvierende Kerngenom kompensiert werden (Maier *et al.*, 2008). Im Einklang mit dieser Hypothese stehen die PPR-Proteine, die als *restorer of fertility* in CMS-Pflanzen die Expression toxischer Genprodukte inhibieren und so eine funktionelle plastidäre Genexpression wiederherstellen (Chase *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2008). Auch das Edieren lässt sich einfacher mit der Unterdrückung einer Punktmutation als mit einer regulativen Funktion erklären (Maier *et al.*, 2008; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Denn das experimentelle Entfernen von Edierungsstellen führt zu keinen offensichtlichen Defekten für die Pflanze (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005a). Noch lässt sich jedoch nicht endgültig ableiten, warum die PPR-Proteine gerade in höheren Pflanzen so zahlreich sind und welche Funktion sie genau ausüben. Weitere Analysen von PPR-Proteinen können helfen, die generelle Funktion dieser Proteinfamilie aufzuklären.

1.3 Unterschiede in der Rolle der Plastiden in *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana gilt als Modellpflanze der Molekularbiologie, denn das Kerngenom ist mit 125 Mb verhältnismäßig klein und wurde als erstes Pflanzengenom vollständig sequenziert (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Durch die *Syngenta Arabidopsis Insertion Library* (Sessions *et al.*, 2002), die GABI-Kat-Datenbank (Rosso *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003, 2007) sowie die T-DNA-Insertionslinien des Salk-Institutes (Alonso *et al.*, 2003) stehen zahlreiche *Arabidopsis*-Mutanten zur Verfügung. Entsprechend basieren derzeit die meisten

funktionellen Analysen von PPR-Genen auf Studien an *Arabidopsis*-PPR-Mutanten (Überblicken in Delannoy *et al.*, 2007; Andrés *et al.*, 2007; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Ein beträchtlicher Teil der PPR-Gene ist dieser Charakterisierungsmethode jedoch nicht zugänglich, denn der *knockout* vieler Gene der PPR-Familie in *Arabidopsis* führt zu Embryoletalität (Lurin *et al.*, 2004; Cushing *et al.*, 2005; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass Plastiden in *Arabidopsis* frühzeitig, bevor sich die Befähigung zur Photosynthese entwickelt, essentiell für die Embryogenese sind (Cushing *et al.*, 2005) und ein Verlust der plastidären Translation Embryoletalität zur Folge hat (Berg *et al.*, 2005; Ruppel und Hangarter, 2007). Interessanterweise scheint dies für monokotyle Spezies nicht zu gelten, wie z. B. die Plastiden-Ribosomen-defizienten Mutanten *iojap* in Mais und *albostrians* in Gerste belegen (Stern *et al.*, 2004; Walbot und Coe, 1979; Hess *et al.*, 1994). Für das plastidär lokalisierte Protein PPR4 konnte gezeigt werden, dass ein *knockout* von *ppr4* in *Arabidopsis* Embryoletalität verursacht, KO-Pflanzen des orthologen Mais-Gens keimen jedoch und erlauben eine weitergehende molekularbiologische und biochemische Charakterisierung (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006). Somit bieten sich gerade für die Analyse essentieller plastidärer PPR-Proteine monokotyle Pflanzen wie *Zea mays* an. Eine Ursache für die unterschiedliche Rolle, die Plastiden offenbar in der Entwicklung von eudikotylen und monokotylen Pflanzen spielen, könnten verschiedene Kodierungspotentiale plastidärer Genome sein (Stern *et al.*, 2004).

Auch die plastidären Proteome von *Arabidopsis* und *Oryza* geben Hinweise, dass die Funktion der Plastiden in Eudikotylen und Monokotylen nicht zwingend identisch ist. Nach einer Studie von Richly und Leister werden in *Arabidopsis thaliana* ca. 2100 Kern-kodierte Proteine in die Chloroplasten importiert, während es in Reis 4800 sind. Vergleichende Analysen ergeben, dass ein Teil der plastidär lokalisierten Proteine bei beiden Arten übereinstimmt, es handelt sich hierbei vor allem um ein Basis-Set cyanobakterieller Proteine. Unterschiede in den Zusammensetzungen ihrer Chloroplastenproteome deuten jedoch auch divergierende Entwicklungen der Plastiden innerhalb der Angiospermen an (Richly und Leister, 2004). So stellt sich zum einen die Frage, welche Aussage zur Funktion orthologer plastidärer PPR-Proteine in Mono- und Eudikotylen möglich ist. Zum anderen ist im Zusammenhang mit der Charakterisierung von PPR-Proteinen, die in *Arabidopsis* essentiell sind, speziell die unterschiedliche Bedeutung, die Chloroplasten für die Embryogenese bei Monokotylen und Eudikotylen haben, von Interesse.

1.4 Zielstellung

Die Expression des plastidär kodierten genetischen Materials ist durch einen höchst komplexen RNA-Metabolismus gekennzeichnet, welcher den Import zahlreicher Kern-kodierter RNA-Bindeproteine in die Chloroplasten erfordert (Maier *et al.*, 2008). Mit wahrscheinlich mehr als hundert Proteinen stellen die PPR-Proteine eine ausgesprochen große Gruppe putativ RNA-bindender Faktoren in den Plastiden der Angiospermen (Lurin *et al.*, 2004). Doch zu Beginn der vorliegenden Arbeit war lediglich für zwei Beispiele, CRP1 und PPR4, eine Assoziation mit definierten plastidären Transkripten *in vivo* gezeigt worden (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b, 2006). Deshalb sollte die kurz zuvor erstmalig beschriebene RIP-Chip-Methode (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b, siehe Material und Methoden 2.2.19) genutzt werden, um *in vivo* die Ziel-RNA eines weiteren plastidär lokalisierten PPR-Proteins, PPR5, in Mais zu ermitteln.

Parallel dazu sollten *ppr5*-Insertionsmutanten analysiert werden. Dies diene einer genauen Bestimmung der Funktion von PPR5. Dabei war insbesondere der Metabolismus der Transkripte, mit denen das Protein spezifisch interagiert, in den Mutanten zu untersuchen. Interessanterweise ist das Orthologe von PPR5 in *Arabidopsis thaliana* essentiell für die Embryonalentwicklung (Cushing *et al.*, 2005). Die Charakterisierung von PPR5 zielte auch darauf ab, eine Hypothese entwickeln zu können, weshalb so viele plastidäre PPR-Mutanten in *Arabidopsis* Embryoletalität zeigen, während dies nicht für PPR-Nullmutanten in Mais gilt (Stern *et al.*, 2004).

Weitere Projekte sollten sich Aspekten der Evolution der Familie der PPR-Proteine widmen. Zunächst sollten die nächsten Verwandten, die Paralogen, von PPR5 in Mais bestimmt und Transposon-induzierte Mutanten aus einer Kollektion von Mais-Insertionslinien der Universität Oregon für diese isoliert werden. In ersten Analysen der Mutanten sollte überprüft werden, ob sie ähnliche Defekte wie die *ppr5*-Mutanten zeigen.

Neben diesen Studien paraloger Proteine sollten auch orthologe PPR-Proteine betrachtet werden. Aufgrund der strengen Konservierung der PPR-Proteine zwischen Monokotylen und Eudikotylen über etwa 150 Mio. Jahre wird angenommen, dass die Funktion orthologer Proteine entsprechend konserviert ist (O'Toole *et al.*, 2008). Doch erst vergleichende Analysen können darüber Aufschluss geben. In Vorarbeiten von M. Tillich (nicht publiziert) wurden bereits Mutanten des plastidären Gens *Atppr54* charakterisiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von PPR54 in der einkeimblättrigen Pflanze Mais zu untersuchen. Dazu

waren *ppr54*-Mais-Mutanten zu identifizieren und es war zu bestimmen, ob der von den *Arabidopsis*-Mutanten bekannte Defekt in der Prozessierung einer plastidären mRNA ebenfalls vorliegt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Plastik-Einmalartikel wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg), Biozym Scientific GmbH (Oldendorf), Starlab GmbH (Ahrensburg) sowie Greiner BIO-ONE GmbH (Frickhausen) bezogen.

Es wurden, wenn nicht anders angegeben, Geräte der Hersteller BioRad Laboratories GmbH (München), Applied Biosystems (Weiterstadt), PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen), neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg) und Heraeus (Newport Pagnell, UK) verwendet. Weitere Materialien sind im Folgenden explizit aufgeführt.

2.1.1 Pflanzenmaterial

Es wurden Wildtyp-Pflanzen von *Zea mays* der Kultivare B73, A632 und A188 sowie Mutagen-induzierte Mutanten der *Photosynthetic Mutant Library* (PML) der Universität Oregon (<http://pml.uoregon.edu/pml.html>) verwendet (siehe Auflistung unten). Die Samen wurden, soweit sie nicht auf Nachzuchten zurückgehen, freundlicherweise von Prof. Dr. Alice Barkan (Universität Oregon, USA) zur Verfügung gestellt.

Mais-Mutanten:

<i>ppr5-1, ppr5-2</i>	Beick <i>et al.</i> , 2008
<i>ppr2-4</i>	Williams und Barkan, 2003
<i>ppr50-3, ppr50-4</i>	diese Arbeit, in Zusammenarbeit mit S. Finster
<i>ppr51-1, ppr51-2</i>	diese Arbeit
<i>ppr54</i>	diese Arbeit
<i>ppr4-1 x ppr4-2</i>	Schmitz-Linneweber <i>et al.</i> , 2006
<i>hcf7</i>	Barkan, 1993

Die Isolation von Mais-Chloroplastenstroma erfolgte aus Pflanzen der Linie Tassilo (Camena Samen, Lauenau).

Von *Arabidopsis thaliana* wurden Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps *Columbia* und T-DNA-Insertionsmutanten der Sammlung des Salk-Institutes (Alonso *et al.*, 2003) genutzt.

2.1.2 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21 DE3 Expressionszellen	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (siehe Anhang 2, Tab. 3) wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) synthetisiert.

2.1.4 Chemikalien

Chemikalien wurden, sofern nicht unten aufgeführt, von den Firmen Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe), SERVA Feinbiochemica (Heidelberg), Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

Agar	remel Inc. (Lenexa, USA)
CDPStar	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Coomassie G-250 Stain	Invitrogen (Karlsruhe)
Desoxyribonukleotide	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Glykogen	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
1-Methyl-2-pyrrolidinon	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
MS-Basismedium	Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande)
Ni-NTA-Agarose Suspension	QIAGEN GmbH (Hilden)
rec-Protein A Sepharose 4B	Invitrogen (Karlsruhe)
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science (Verviers, Belgien)
TRIzol Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.5 Radiochemikalien

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000 Ci/mmol
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$, 3000 Ci/mmol
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 3000 Ci/mmol

Die genannten Radiochemikalien wurden von GE Healthcare (München) und PerkinElmer (Waltham, USA) bezogen.

2.1.6 DNA- und RNA-Längenmarker und Protein-Molekulargewichtsstandards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RiboRuler Low Range RNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RiboRuler High Range RNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

2.1.7 Enzyme

DNase I, Recombinant	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Omniscript Reverse Transcriptase	QIAGEN GmbH (Hilden)
Phusion Hot Start DNA Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
RNase A	Boehringer GmbH (Mannheim)
RNase Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T4 RNA Ligase	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
TaKaRa Ex Taq	TaKaRa Bio Inc. (Otsu, Japan)
Taq DNA Polymerase	QIAGEN GmbH (Hilden)

2.1.8 Kits

ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems (Weiterstadt)
ASAP RNA Labeling Kit	PerkinElmer (Waltham, USA)
DecaLabel DNA Labeling Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
DYEnamic ET Terminator Chemistry Kit	GE Healthcare (München)

Extract-N-Amp Plant PCR Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
HexaLabel DNA Labeling Kit	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
QIAexpress Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH (Hilden)

2.1.9 Membranen, Filterpapiere, Röntgenfilme und *screens*

Hybond N ⁺ -Membran	GE Healthcare (München)
Hybond N-Membran	GE Healthcare (München)
Hybond C extra-Membran	GE Healthcare (München)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman Paper (Maidstone, UK)
Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare (München)
K-Type Imaging Screen	BioRad Laboratories GmbH (München)

2.1.10 Antikörper und Seren

Die folgenden kommerziell erhältlichen Antikörper wurden genutzt:

Anti-DIG-Antikörper	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Goat Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate	BioRad Laboratories GmbH (München)
Rabbit IgG TrueBlot, HRP-conjugated	eBioscience Inc. (Hatfield, UK).

Zur Gewinnung polyklonaler Antiseren gegen PPR50 und PPR51 wurden im Rahmen dieser Arbeit Antigene rekombinant exprimiert. Die Kaninchen-Antiseren wurden von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) generiert. Peptidantikörper wurden von Agrisera (Vännas, Schweden) bezogen.

Polyklonale Antikörper gegen PPR2, PPR5, OEC23, OEC16 und CAF1 sowie alle Antiseren gegen Komponenten des Photosyntheseapparates wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alice Barkan (Universität Oregon, USA) zur Verfügung gestellt (Williams und Barkan, 2003; Beick *et al.*, 2008; Ostheimer *et al.*, 2003; Voelker und Barkan, 1995).

2.1.11 *Software-Programme und -Algorithmen zur Sequenzanalyse*

Es wurden übliche Graphik- und Office-Programme genutzt. Folgende Programme und Algorithmen wurden darüber hinaus verwendet.

BLAST	Altschul <i>et al.</i> , 1997
ClustalW	Thompson <i>et al.</i> , 1994
GPRana	http://indiji.com/gprana.html
Lasergene Software	GATC Biotech (Konstanz)
Multalin (Version 5.4.1)	Corpet, 1988
Oligo Calc	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
PlantGDB	http://www.plantgdb.org/
POGs Datenbank	http://pogs.uoregon.edu
Predotar V1.03	Small <i>et al.</i> , 2004
Signal	http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress
TAIR	http://www.arabidopsis.org/
TargetP	Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000
TPRpred	Karpenahalli <i>et al.</i> , 2007
TreeView	Page, 1996

2.2 Methoden

Die Herstellung von Lösungen und Medien erfolgte mit zweifach destilliertem Wasser (Reinstwasseranlage PURELAB Ultra, ELGA LabWater, Wycombe, UK), sie wurden ggf. zur Sterilisation bei 212 °C, 55 kPa, 20 min autoklaviert. Dienten Lösungen der Arbeit mit RNA, wurden sie durch Millex GS Filter 0,22 µm (Millipore GmbH, Schwalbach) steril filtriert.

2.2.1 Pflanzenanzucht

2.2.1.1 Aussaat und Kultivierung von *Zea mays*

Mais-Samen wurden in einer Mischung aus einem Fünftel Vermiculit und vier Fünfteln Erde ausgesät und zum Schutz vor Austrocknung mit Erde bedeckt. Die Keimlinge wurden, wie in

Beick *et al.* (2008) beschrieben, unter Langtagbedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) bei 27 °C angezogen und zur Isolation von Nukleinsäuren und Proteinen ca. sieben bis zehn Tage nach der Aussaat geerntet.

2.2.1.2 Aussaat und Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst für mindestens drei Tage bei 4 °C gelagert und anschließend auf Anzuchterde, versetzt mit einem Zehntel Quarzsand, ausgesät. Sie wurden unter Langtagbedingungen bei 23 °C kultiviert. Für den Keimungstest wurden Samen von *Arabidopsis thaliana* sterilisiert wie von der GABI-Kat-Initiative beschrieben (<http://www.gabi-kat.de/faq/sul-selection-scheme.html>) und auf MS-Medium ausgebracht.

MS-Medium: 0,44% (w/v) MS-Basismedium (pH 5,8 mit KOH); 3% (w/v) Saccharose (verändert nach Murashige und Skoog, 1962)

2.2.2 Anzucht von *Escherichia coli*

Transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf LB-Agarplatten (versetzt mit Antibiotika, der Plasmid-kodierten Resistenz entsprechend) ausplattiert und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte bei 37 °C auf einem Schüttler mit 220 rpm.

LB-Medium (flüssig): 1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl (nach Bertani, 1951)

LB-Medium (fest): LB-Medium (flüssig), versetzt mit 1,5% (w/v) Agar

2.2.3 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräparation)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte durch alkalische Zelllyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979). Die Bakterienzellen einer 4 ml-LB-Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet und in 200 µl Lösung E1 resuspendiert. Es folgte eine alkalische Lyse durch Zugabe von 200 µl Lösung E2. Nach 4 min wurden 200 µl Lösung E3 zur Neutralisation zum Lysat gegeben. Zur Fällung der Proteine wurde die Probe 10 min auf Eis inkubiert, die denaturierte chromosomale DNA und Proteinbestandteile wurden bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA des klaren Überstandes wurde durch Zugabe

von 45% (v/v) Isopropanol gefällt und das Sediment in 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die Luft-getrocknete Plasmid-DNA wurde in 100 µl *A. bidest.* aufgenommen.

Lösung E1:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 0,1% (w/v) RNase A
Lösung E2:	200 mM NaOH; 1% SDS
Lösung E3:	3,2 M Natriumacetat (pH 5,5)

2.2.3.2 Isolation von genomischer DNA

Die Extraktion von Gesamt-DNA aus *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* erfolgte mit Hilfe eines CTAB-Isolationspuffers, verändert nach Stewart und Via (1993). Etwa 1 g Blattgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsernt. Das Homogenisat wurde in 1 ml 2x CTAB-Extraktionspuffer aufgenommen und 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt (9000 rpm) wurde der Überstand mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und erneut zentrifugiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert, in 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung in TE-Puffer resuspendiert. Es schloss sich ein RNase-Verdau, durch Zugabe von 1 µl RNase A (10 mg/ml) und 30 min Inkubation bei 37 °C, an.

2x CTAB-Extraktionspuffer:	2% (w/v) CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% (w/v) PVP40; 100 mM Tris-HCl (pH 8); 0,2% (v/v) β-Mercaptoethanol
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA

Kleine Mengen Gesamt-DNA zur Genotypisierung wurden alternativ unter Verwendung des Extract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) gemäß den Vorgaben des Herstellers isoliert.

2.2.3.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.4 Isolation von RNA

Gesamt-RNA aus *Zea mays* wurde mittels TRIzol Reagent (Invitrogen, Karlsruhe), den Vorgaben des Herstellers entsprechend, isoliert.

RNA aus Chloroplastenstroma und Immunopräzipitaten wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen wie in Ostheimer *et al.* (2003) beschrieben. Als Fällungshilfe wurde anstelle von Hefe-tRNA Glykogen verwendet.

2.2.4 Reinigung, Konzentration und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Reinigung von PCR-Produkten und von Plasmid-DNA wurde das QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) wie im Protokoll des Herstellers beschrieben eingesetzt. Die Reinigung Fluoreszenz-markierter RNA (siehe 2.2.19) erfolgte mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN GmbH, Hilden).

Zur Überführung von DNA und RNA in kleinere Volumina wurden die Proben mit je 1 µl Glykogen, 2,5 Volumen 96% (v/v) Ethanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt. Die Proben wurden für mindestens 40 min bei -70 °C gekühlt und anschließend bei 4 °C und 13000 rpm 35 min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend in *A. bidest.* aufgenommen (nach Sambrook und Russel, 2001).

Um die Konzentration von DNA oder RNA zu ermitteln, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wie vom Hersteller empfohlen gemessen.

Zusätzlich wurde die Konzentration von DNA im Agarosegel (siehe 2.2.11.1) optisch abgeschätzt. Dazu wurden parallel zu den Proben Mengenstandards der Fermentas GmbH (siehe 2.1.6) auf das Gel aufgetragen und die Intensität der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden im Transilluminator (GelDoc XR System, BioRad Laboratories GmbH, München) verglichen.

2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR-Protokolle umfassten eine 3-minütige Denaturierung der DNA, 30 bis 35 PCR-Zyklen und eine abschließende 5-minütige Elongation. Jeder der Zyklen setzte sich zusammen aus einer Denaturierung bei 94 °C (30 s), einer Phase der Anlagerung der Starter-oligonukleotide von 30 s, wobei die Temperatur entsprechend des verwendeten Oligonukleotid-Paares gewählt wurde, und einer Elongationsphase bei 72 °C von 1 min je 1 kb

Fragment. Zur Amplifikation wurden 1 U Taq DNA Polymerase (QIAGEN GmbH, Hilden), 100 ng DNA, 0,2 μ M je Oligonukleotid und 0,2 mM je dNTP in 1x Taq DNA Polymerase Puffer verwendet. Die Reaktionen erfolgten in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf). Die Analyse der PCR-Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.11.1) vorgenommen.

Für die Identifikation von Mu-Transposon-induzierten Mutanten (2.2.15) wurde die TaKaRa ExTaq (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) verwendet. Wurde DNA mittels Extract-N-Amp Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) isoliert, wurde der dem Kit beigegefügte PCR-Mix den Herstellerangaben folgend für die PCR eingesetzt. Die Amplifikation aus *ppr5*-cDNA erfolgte mit der Phusion Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) wie in Beick *et al.* (2008) beschrieben.

2.2.5.1 Kolonie-PCR

Um die Größe klonierter Produkte in *E. coli* Plasmiden zu prüfen, wurde die Methode der Kolonie-PCR genutzt. In einem Ansatz von 20 μ l wurden 1 U Taq DNA Polymerase (QIAGEN GmbH, Hilden), 0,25 μ M pro Starteroligonukleotid und 0,2 mM je dNTP in 1x Taq DNA Polymerase Puffer verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden mit einer Pipettenspitze minimale Mengen der Kolonie in den PCR-Ansatz transferiert. In der Regel wurden Vektor-spezifische Oligonukleotide eingesetzt. Die initiale Denaturierung betrug 10 min bei 95 °C, die folgenden 35 Zyklen entsprachen dem oben beschriebenen Standardprotokoll.

2.2.6 Synthese und Markierung von Hybridisierungssonden

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden erfolgte wie in Beick *et al.* (2008) beschrieben. Zur Markierung von Oligonukleotiden wurden in einem Ansatz von 20 μ l 100 pmol des Oligonukleotids, 10 U T4 Polynukleotidkinase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und 50 μ Ci [γ -³²P]ATP in 1x Puffer A für T4 Polynukleotidkinase eingesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

Radioaktiv zu markierende DNA-Fragmente wurden mittels PCR amplifiziert (siehe Protokoll 2.2.5). Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gereinigt. Die Markierung erfolgte mit dem HexaLabel oder dem DecaLabel DNA Labeling Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) unter Verwendung von 100 ng Amplifikat und 50 μ Ci [α -³²P]dCTP gemäß den Vorgaben des Herstellers. Zur Eliminierung nicht-inkorporierter Nukleotide wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide und PCR-Produkt-

Sonden über illustra MicroSpin G-25 Säulen (GE Healthcare, München) den Herstellerangaben entsprechend gereinigt.

Die Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin erfolgte unter Verwendung von 0,5 nmol Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem ansonsten dem Standardprotokoll entsprechenden 50 µl PCR-Ansatz (2.2.5). Die Sonde wurde durch Agarosegel-Elution gereinigt (2.2.3.3).

2.2.7 Synthese von cDNA

2.2.7.1 DNase-Verdau von RNA

Um kontaminierende genomische DNA aus Gesamt-RNA-Präparationen zu eliminieren, wurde DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Es schlossen sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Phenol-Extraktion an (Sambrook und Russel, 2001). Die RNA wurde durch Natriumacetat-Ethanol-Fällung in ein kleineres Volumen überführt wie in 2.2.4 beschrieben.

2.2.7.2 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA erfolgte im Allgemeinen unter Verwendung der Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN GmbH, Hilden). Es wurden etwa 5 µg DNase-verdaute RNA und *random* Hexamer- und Nonamer-Oligonukleotide (Endkonzentration 10 µM) oder Gen-spezifische Oligonukleotide (Endkonzentration 0,5 µM) eingesetzt. Die Reaktion wurde dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll entsprechend durchgeführt.

Wenn die so generierte cDNA von unzureichender Qualität war, wurden alternativ die SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) oder das Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) den Herstellerangaben folgend verwendet.

2.2.8 Bestimmung von Transkriptenden

Zur Bestimmung von Transkripttermini kamen zwei Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde die RNA zirkularisiert, gefolgt von einer reversen Transkription über die Ligationsstelle des 3'- und 5'-Transkriptendes (siehe 2.2.8.2; Yokobori und Pääbo, 1995; Vogel und Hess, 2001). Zum anderen wurde die 5'-RACE-Technik (*rapid amplification of cDNA ends*)

genutzt. Dazu wurde ein RNA-*linker*-Oligonukleotid an die 5'-Enden der Transkripte ligiert und diese dann, inklusive der *linker*-Sequenz, revers transkribiert (siehe 2.2.8.3; Bensing *et al.*, 1996; Kühn *et al.*, 2005). Per PCR wurden die so generierten cDNAs amplifiziert, wobei bei der 5'-RACE-PCR ein *linker*-spezifisches und ein Gen-spezifisches Oligonukleotid eingesetzt wurden. Es folgte die Klonierung und schließlich Sequenzierung der Produkte (2.2.10 und 2.2.14).

2.2.8.1 Behandlung mit *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP)

Zunächst fand ein DNase-Verdau der RNA statt, wie unter 2.2.7.1 beschrieben. Um primäre, also unprozessierte, Transkripte einer Reaktion mit der T4 RNA Ligase zugänglich zu machen, wurden die 5'-Triphosphate der Primärtranskripte durch eine TAP-Behandlung entfernt, dem Protokoll von Kühn *et al.* (2005) folgend (siehe Abb. 7A). Parallel wurden Ansätze ohne vorherige TAP-Behandlung in die Ligationsreaktion eingebracht. Ein Vergleich der Sequenzen beider Ansätze erlaubte eine differentielle Analyse primärer und bereits prozessierter Transkripte (Kühn *et al.*, 2005).

2.2.8.2 RNA-Zirkularligation

Die Zirkularisierung orientierte sich an den von Yokobori und Pääbo (1995) und Vogel und Hess (2001) beschriebenen Protokollen mit geringfügigen Modifikationen. Nach einem RNA-Denaturierungsschritt von 2 min bei 70 °C wurde die Probe auf Eis überführt. Die Ligation wurde mit 40 U T4 RNA Ligase (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) in 1x T4 RNA Ligase Puffer und unter Zugabe von ATP (1 mM finale Konzentration, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und RiboLock RNase Inhibitor (80 U, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) angesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkription wurde wie im Kapitel 2.2.7.2 dargestellt durchgeführt. Es folgte eine PCR (Abb. 7B) und die Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese sowie Klonierung und Sequenzierung.

2.2.8.3 5'-RACE-Technik

Anders als in der Zirkularligation wurde mit dieser Kartierung nur das 5'-Ende bestimmt. Die Methode entsprach exakt der von Kühn *et al.* (2005) beschriebenen, auch das in der Studie genutzte *linker*-Oligonukleotid wurde verwendet. Die Abbildung 7C illustriert die Vorgehensweise.

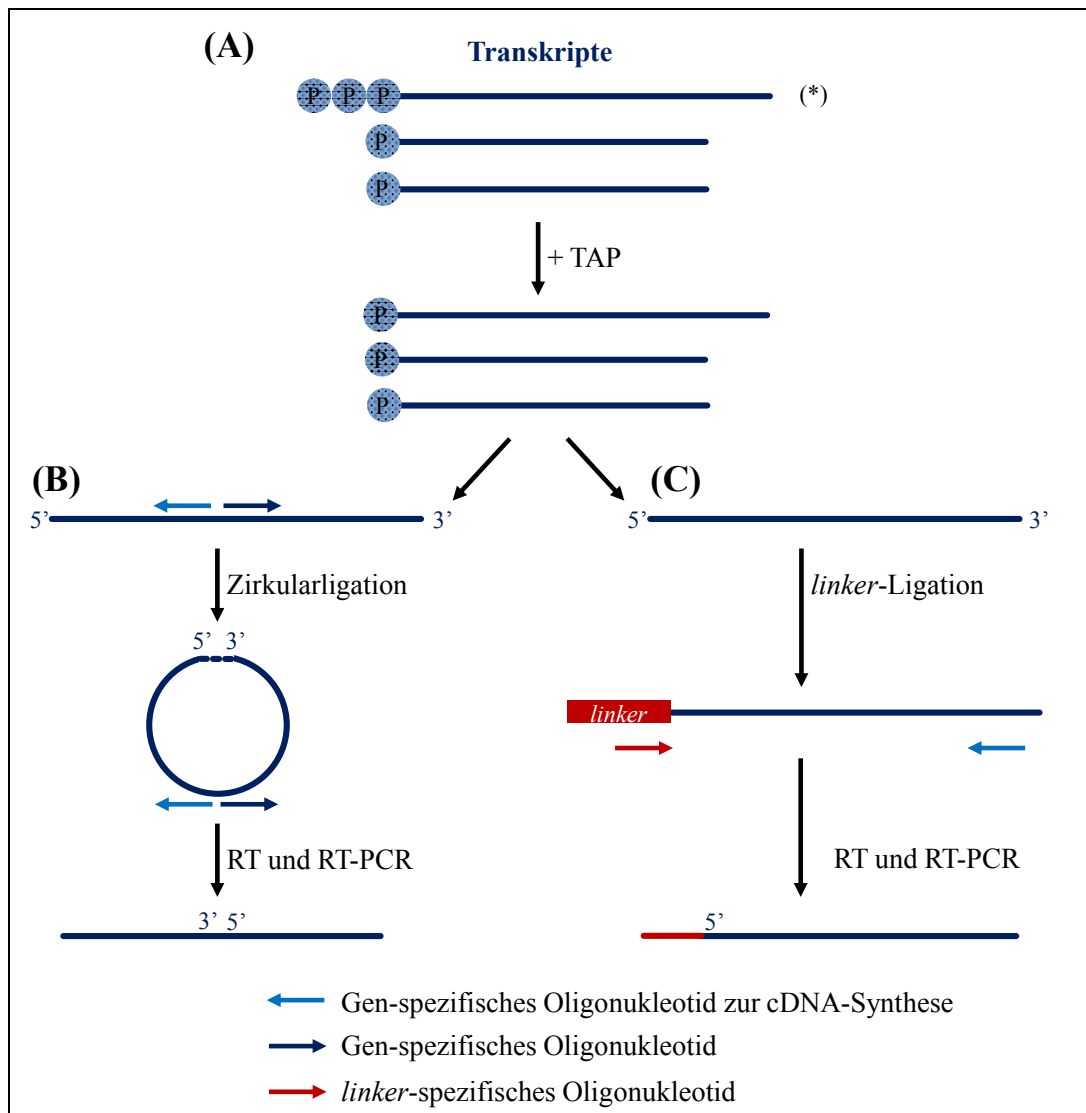


Abb. 7: Bestimmung von Transkripttermini (nach Kühn *et al.*, 2005 und Vogel und Hess, 2001)

Schematische Darstellung verschiedener RT-PCR-Techniken. (A) Vorbereitende Behandlung mit TAP nach Kühn *et al.* (2005). Mit (*) gekennzeichnete primäre Transkripte besitzen Triphosphate an den 5'-Enden, die für eine Ligation in Monophosphate überführt werden müssen. (B) Zirkularligation nach Vogel und Hess (2001). (C) Ligation mit einem RNA-linker nach Kühn *et al.* (2005). Dargestellt sind jeweils die vorliegenden Transkripte sowie die durch die RT-PCR generierten Amplifikate.

2.2.9 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Fragmentierung von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte 1 h bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Zu etwa 1 bis 3 µg Plasmid-DNA wurden 2 U Restriktionsendonuklease (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und der entsprechende Reaktionspuffer (einfache Finalkonzentration) gegeben. Für einen Doppelverdau wurde ein für beide Enzyme optimaler Puffer den Empfehlungen der Fermentas GmbH folgend gewählt.

2.2.10 Klonierung in *E. coli*

2.2.10.1 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in den Vektor pDrive wurde das QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß den Vorgaben des Herstellers genutzt. Ligationen in den pET15b-Vektor (Merck KGaA, Darmstadt) erfolgten in einem 10 µl Ansatz mit 30 ng geschnittenem Vektor, dem Insert in einem dreifach molaren Überschuss und 0,5 U T4 DNA Ligase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) in 1x T4 DNA Ligase Puffer. Die Reaktion wurde über Nacht in einem Wasserbad inkubiert, wobei die Temperatur zunächst bei 21 °C lag und dann langsam bis auf 4 °C absank.

2.2.10.2 Transformation

Transformationen erfolgten mit bei -70 °C gelagerten, chemisch kompetenten *E. coli* Top10- (Invitrogen, Karlsruhe) oder BL21-Zellen (Merck KGaA, Darmstadt) und orientierten sich an der in Sambrook und Russel (2001) beschriebenen Methode. Dabei wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 5 µl Ligationsansatz dazu gegeben und beides 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock von 1 min bei 42 °C sollten die Vektoren in die Zellen aufgenommen werden. Der Ansatz wurde für 2 min wieder in das Eisbad überführt, anschließend wurden 300 µl SOC-Medium (nach Hanahan, 1983) dazu gegeben und die *E. coli*-Zellen 1 h bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Die transformierten Zellen wurden zur Selektion auf LB-Platten, versehen mit Antibiotika der Resistenz des Vektors entsprechend, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium: 2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl;
 2,5 mM KCl; 10 mM MgSO₄ (pH 7); 10 mM MgCl₂; 20 mM
 Glucose

2.2.11 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

2.2.11.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Das Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren beruht darauf, dass sich verschieden große Fragmente bei angelegter Spannung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Gelmatrix in Richtung des positiven Pols bewegen. Wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches mit DNA interkaliert, werden die Banden unter UV-Licht im

Transilluminator (GelDoc XR System, BioRad Laboratories GmbH, München) durch Fluoreszenz sichtbar (Sambrook und Russel, 2001). Die Vorbereitung des Agarosegels und die Durchführung der Elektrophorese entsprachen dem in Sambrook und Russel (2001) vorgestellten Standardprotokoll. Es wurden Apparaturen der PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) genutzt. Die Konzentration der Agarose im Gel betrug je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente 1,0 bis 2,0% (w/v). Zur Auftragung wurden die Proben mit 0,2 Volumen Ladepuffer versetzt. Die Größe der Fragmente konnte im Vergleich mit DNA-Markern der Fermentas GmbH (2.1.6) bestimmt werden. Als Laufpuffer diente 1x TAE.

1x TAE:	40 mM Tris-HCl; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA (pH 8,0)
DNA-Agarosegel:	1,0 – 2,0% (w/v) Agarose in 1x TAE; 0,4 µg/ml Ethidiumbromid
DNA-Ladepuffer:	50% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA (pH 8); 0,25% (w/v) Xylencyanol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau in 5x TAE

2.2.11.2 Auftrennung von RNA im Agarosegel

Es wurden je nach Experiment zwischen 0,5 und 10 µg Gesamt-RNA mit RNA-Probenpuffer versetzt, bei 75 °C 10 min denaturiert und sofort auf Eis überführt. Dann wurden die Proben mit 0,1 Volumen 10x RNA-Ladepuffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte in 1,2%igen Agarose-Formaldehydgelen in 1x MOPS-Laufpuffer bei 110 V (nach Barkan, 1988).

1x MOPS:	20 mM MOPS; 8 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA
RNA-Agarosegel:	1,2% (w/v) Agarose; 23% (v/v) Formaldehyd in 1x MOPS (pH 8)
1x MOPS-Laufpuffer:	10% (v/v) Formaldehyd in 1x MOPS (pH 7)
RNA-Probenpuffer:	25% (v/v) Formaldehyd; 70% (v/v) Formamid in 1,25x MOPS, (pH 7)
10x RNA-Ladepuffer:	50% (v/v) Glycerin; 10 mM EDTA (pH 8); 0,25% (w/v) Xylencyanol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau

2.2.11.3 Auftrennung von RNA oder cDNA im denaturierenden Polyacrylamidgel

Um kleinere RNA-Fragmente unter 100 bp detailliert aufzutrennen, wurden Gele mit 20% Polyacrylamid verwendet. Zur Auftrennung der *poisoned primer extension*- und *primer extension*-Produkte (2.2.13) wurden 15% Polyacrylamidgele genutzt. Zum Gießen des Gels

und für die Elektrophorese wurden Apparaturen von BioRad Laboratories GmbH (München) verwendet. Die RNA-Proben wurden mit 0,2 Volumen RNA-PAGE-Ladepuffer versetzt und bei 75 °C 10 min denaturiert. Anschließend wurden sie in die mit Laufpuffer vorgespülten Taschen geladen und es wurde eine Spannung von 400 V angelegt. RNA-Gele wurden nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE) angefärbt, um die Beladung zu visualisieren.

1x TBE:	90 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA (pH 8,3)
Polyacrylamidgel:	7 M Harnstoff; 15% bis 20% Polyacrylamid in 0,5x TBE
Laufpuffer:	0,5x TBE
RNA-PAGE-Ladepuffer:	95% (v/v) Formaldehyd; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau in 0,25x TBE

2.2.12 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren mit DNA-Sonden

2.2.12.1 Southern-Transfer

Die Übertragung von im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺-Membran; GE Healthcare, München) erfolgte nach der von Southern entwickelten Transfer-Methode mittels Kapillarkraft (Southern, 1975). Dazu wurde das Gel zunächst zweimal 15 min in Denaturierungspuffer, dann 10 min in bidestilliertem Wasser und schließlich 15 min in 5x SSC gewaschen. Die Übertragung folgte dem Standardprotokoll des Southern-Transfers (Southern, 1975; Sambrook und Russel, 2001). Als Transferpuffer diente 5x SSC. Die Nukleinsäuren wurden mit dem Filter im GS Gene Linker (BioRad Laboratories GmbH, München; Programm C3 *southern damp membrane*) unter UV-Licht vernetzt.

Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
1x SSC:	0,15 M NaCl; 0,015 M Natriumcitrat (pH 7)

2.2.12.2 Southern-Hybridisierung

Es wurde das Protokoll der Arbeitsgruppe Barkan (Universität Oregon, USA) wie unter <http://pml.uoregon.edu/index.htm.old> beschrieben genutzt. Dabei erfolgte die Hybridisierung bei 65 °C unter kontinuierlicher Drehung. Die Membran wurde zunächst mindestens 30 min in Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) prähybridisiert. Die Digoxigenin-markierte

Sonde (siehe 2.2.6) wurde 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Es folgte die Hybridisierung mit der Membran in Church-Puffer über ca. 16 h. Bei der ersten Verwendung der Sonde wurde diese vor der eigentlichen Hybridisierung mit einer leeren Membran inkubiert. Nach der Southern-Hybridisierung wurde die Membran viermal je 15 min in Waschpuffer (0,2x SSC, 0,1% SDS) gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Immunoblot (2.2.16.4).

Church-Puffer: 7% (w/v) SDS; 1 mM EDTA; 0,5 M NaH₂PO₄ (pH 7,2)

2.2.12.3 Northern-Transfer

Der Northern-Transfer von RNA aus Agarosegel auf eine Hybond N-Membran (GE Healthcare, München) erfolgte mittels Kapillarkraft unter neutralen Bedingungen mit 5x SSC als Transferpuffer nach Standardprotokoll (Sambrook und Russel, 2001; Barkan, 1988).

Für den Transfer von RNA aus Polyacrylamidgelen wurde ein Elektrotransfer im Halbtrockenverfahren genutzt (Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell, BioRad Laboratories GmbH, München). Der RNA-Transfer auf die Hybond N-Membran (GE Healthcare, München) erfolgte in 0,25x TAE 1 h bei 18 mA gemäß den Vorgaben der BioRad Laboratories GmbH.

Nach dem Transfer wurden die Nukleinsäuren mit der Membran kovalent vernetzt. Zunächst wurde die Nylonmembran im GS Gene Linker (BioRad Laboratories GmbH, München; Programm C3) UV-Licht ausgesetzt, anschließend wurde sie 10 min bei 75 °C gebacken. Der erfolgreiche Transfer wurde mittels Methylenblau-Färbung visualisiert (Wilkinson *et al.*, 1991).

Methylenblau-Färbelösung: 0,03% (w/v) Methylenblau in 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2)

2.2.12.4 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung der Membran-gebundenen RNA mit DNA-Sonden (Markierung siehe 2.2.6) erfolgte in Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) bei 50 °C bei der Nutzung von Oligonukleotid-Sonden bzw. bei 65 °C bei der Verwendung von PCR-Sonden (Beick *et al.*, 2008). Auf die Prähybridisierung folgte eine etwa 16-stündige Hybridisierung. Zur Entfernung unspezifisch an die Membran gelagerter Sonde dienten folgende Waschschr

einmal 20 min in 1x SSC und 0,1% SDS (Oligonukleotid-Sonde) bzw. 0,5x SSC und 0,1% SDS (PCR-Sonde) sowie je zweimal 20 min bei 0,5x SSC und 0,1% SDS bzw. 0,2x SSC und 0,1% SDS. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe des PhosphorImager System GS 525 (BioRad Laboratories GmbH, München).

Sollten Membranen erneut verwendet werden, wurden die Sonden von den Filtern entfernt, indem sie zweimal 10 min in siedender 0,1%iger SDS-Lösung inkubiert wurden. Vor der weiteren Verwendung wurde durch Auflegen eines K-Type Imaging Screen (BioRad Laboratories GmbH, München) überprüft, ob die Sonden komplett von den Membranen gelöst wurden.

2.2.13 *Primer extension- und poisoned primer extension-Analyse*

Mit der *primer extension*-Analyse werden RNA-Spezies mittels reverser Transkription unter Verwendung eines radioaktiv markierten Oligonukleotiden nachgewiesen (Sambrook und Russel, 2001). Die so generierten cDNAs werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.11.3) und durch Auflegen strahlungssensitiver Röntgenfilme oder *screens* (PhosphorImager System GS 525; BioRad Laboratories GmbH, München) visualisiert.

Bei einer *poisoned primer extension*-Analyse handelt es sich um eine Abwandlung der *primer extension*-Analyse, bei der eines der Desoxynukleotide in der reversen Transkription durch ein Didesoxynukleotid ersetzt wird, die cDNA-Synthese bricht mit dessen Einbau direkt ab. Liegen verschiedene Transkripte vor, die an das genutzte Oligonukleotid binden, z. B. gespleißte und ungespleißte, können diese, bei entsprechender Wahl des Didesoxynukleotids, anhand unterschiedlich langer cDNA-Abbruch-Produkte differenziert werden. Das Verhältnis beider Synthese-Produkte wird in verschiedenen Transkript-Proben verglichen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006). Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte bei beiden Methoden wie unter 2.2.6 beschrieben. Für die reverse Transkription wurde mit der Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN GmbH, Hilden) nach dem von Schmitz-Linneweber *et al.* (2006) vorgestellten Protokoll gearbeitet.

2.2.14 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Edierungsstellen erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) wie von Tillich *et al.* (2009, ergänzende Informationen)

beschrieben. Dazu wurden der DNA-Sequenzierer ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Weiterstadt) und das DYEnamic ET Terminator Chemistry Kit (GE Healthcare, München) genutzt.

Alle anderen Sequenzierungen wurden mittels ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) unter Verwendung eines ABI 3130XL DNA-Sequenzierers von Dr. Martin Meixner (DLMBC, Rüdersdorf) durchgeführt.

Die Analyse und das Editieren der Sequenzen erfolgten mit der Lasergene *software* (GATC Biotech, Konstanz). Für Datenbankvergleiche wurde der BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) des BLAST-servers des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA) genutzt.

2.2.15 Isolation von Transposon-induzierten Mais-Mutanten

In einem revers genetischen Ansatz wurden PPR-Mutanten aus der ca. 2100 Mu-Transposon-induzierte Mais-Mutanten umfassenden *Photosynthetic Mutant Library* (PML) der Universität Oregon (<http://pml.uoregon.edu/pml.html>) identifiziert. Die Vorgehensweise entsprach der von der Arbeitsgruppe Barkan (Universität Oregon, USA) entwickelten Methode (detailliert von Williams und Barkan (2003) und unter <http://pml.uoregon.edu/index.htm.old> beschrieben). Dabei wurden etwa 110 Proben, die je die DNA-Extrakte von etwa 20 Mais-Keimlingen der Sammlung enthielten, per PCR analysiert. Als Starteroligonukleotide wurden ein Mu-Transposon-spezifisches sowie ein PPR-Gen-spezifisches Oligonukleotid verwendet (siehe Abb. 8), die zuvor in Test-PCRs hinsichtlich ihrer Spezifität ausgewählt wurden. Es schloss sich an die PCR ggf. eine Southern-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde (2.2.6 und 2.2.12.2) und deren Immunodetektion (2.2.16.4) an, um die Sensitivität zu erhöhen. So wurden Proben identifiziert, die zu einem PCR-Produkt führten, d. h., Keimlinge, bei denen ein Mu-Element im untersuchten PPR-Gen inseriert sein könnte. Zur Kontrolle wurden diese Proben einer weiteren PCR mit einem zweiten Gen-spezifischen Oligonukleotid unterzogen. Dann wurden jeweils die 20 individuellen Pflanzen der in beiden PCRs positiven Proben analog mittels PCR und Southern-Hybridisierung analysiert. Schließlich wurde über Verwandte der so identifizierten Pflanzen die Vererbbarkeit der Mu-Insertion untersucht, um mutante Linien von durch Spontantransposition entstandenen somatischen Mutationen unterscheiden zu können.

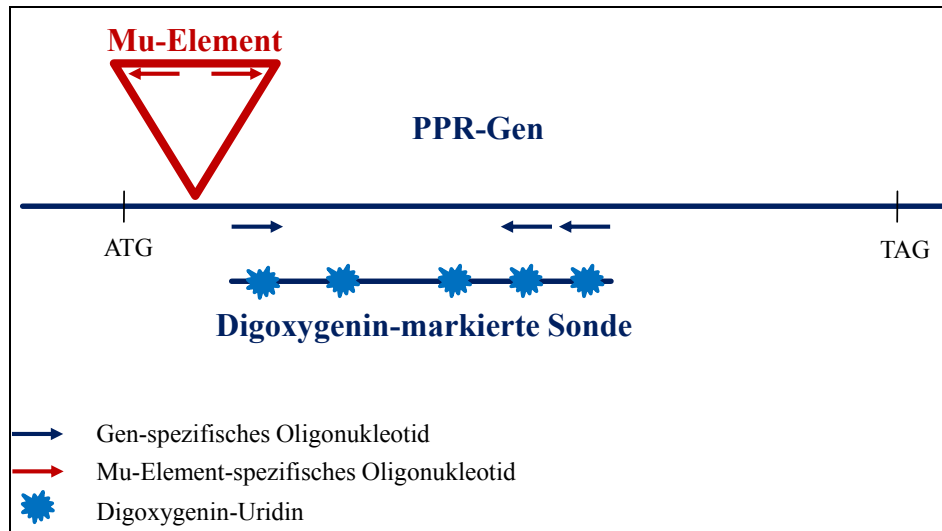


Abb. 8: PCR-Strategie zur Identifikation von Mu-Transposon-induzierten PPR-Mutanten in Mais

Die Abbildung verdeutlicht das Prinzip der Identifikation von PPR-Mutanten in der PML durch PCR. Die Position der gewählten PCR-Starteroligonukleotide ist mittels Pfeilen dargestellt. Diese Oligonukleotide wurden auch zur Amplifikation einer Sonde genutzt.

2.2.16 Methoden zur Analyse von Proteinen

2.2.16.1 Isolation von Gesamt-Protein

Die Extraktion von Gesamt-Protein aus Blattgewebe erfolgte wie von Barkan *et al.* (1986) beschrieben.

2.2.16.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Konzentrationsmessung von Proteinproben wurde Bradford-Reagenz (BioRad Laboratories GmbH, München) den Herstellerangaben entsprechend mit den Proben gemischt und bei 595 nm im Photospektrometer (Lamda 35 UV/Vis PerkinElmer, Waltham, USA) vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration diente eine mit der optischen Dichte von Proteinlösungen bekannter Konzentration selbst erstellte Eichgerade. Die ermittelten Absorptionen wurden entsprechend in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

2.2.16.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Standardprotokoll (Laemmli, 1970; Sambrook und Russel, 2001). Dabei wurde das 13% Polyacrylamid enthaltende Trenngel mit einem Sammelgel (5% Polyacryl-

amid) überschichtet. Die Proben wurden mit 3x SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 75 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 100 V. Es wurden Apparaturen der BioRad Laboratories GmbH (München) genutzt. Um die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurden Marker der Fermentas GmbH (2.1.6) zum Vergleich aufgetragen.

Trenngel:	0,375 M Tris-HCl (pH 8,8); 13% Polyacrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED
Sammelgel:	0,13 M Tris-HCl (pH 6,8); 5% Polyacrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED
3x SDS-Ladepuffer:	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8); 7% (w/v) SDS; 30% (v/v) Glycerol; 7,5% (v/v) β -Mercaptoethanol; 0,25% (w/v) Bromphenolblau
1x SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS (pH 8,8)

2.2.16.4 Western-Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteinproben und Immunodetektion

Die Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinproben auf eine Hybond C extra-Membran (GE Healthcare, München) erfolgte in entsprechenden Apparaturen der BioRad Laboratories GmbH (München) bei 100 V für ca. 1 h in 1x Transferpuffer (Sambrook und Russel, 2001). Die Effizienz des Transfers wurde durch Färbung der Membran in Ponceau-Lösung überprüft (Klein *et al.*, 1995).

Für die Immunodetektion wurde die Membran zunächst in 4%iger Trockenmilchlösung 1 h blockiert. Ebenfalls 1 h wurde die Membran mit dem primären Antikörper (je nach genutztem Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 bis 1:10000 in 1x TBST) inkubiert. Nach drei bis sechs Waschschritten für je 15 min in 1x TBST folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG, BioRad Laboratories GmbH, München; Rabbit IgG TrueBlot, eBioscience Inc., Hatfield, UK). Dieser bindet den primären Antikörper und ermöglicht durch Konjugation mit einer Peroxidase-Aktivität dessen Detektion durch Chemolumineszenz. Dafür wurde der Filter nach erneutem Waschen wenige Minuten in der frisch angesetzten Detektionslösung geschwenkt und die Reaktion mittels Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm MP; GE Healthcare, München) visualisiert (Sambrook und Russel, 2001).

1x Transferpuffer:	025 mM Tris-HCl; 0,2 M Glycin; 20% (v/v) Methanol
Ponceau-Lösung:	2% (w/v) PonceauS; 1,8 M Trichloressigsäure; 1,2 M Sulfosalicylsäure
1x TBST:	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween20
Blockierlösung:	4% (w/v) Trockenmilch in 1x TBST
Detektionslösung:	0,45 mM Coumarat; 1,25 mM Luminol; 0,01% (w/v) H ₂ O ₂ in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5)

2.2.17 Methoden zur Gewinnung polyklonaler Kaninchen-Antikörper

2.2.17.1 Heterologe Expression rekombinanter Polypeptide (Antigene)

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in pET15b, eingebracht in *E. coli* BL21 Expressionszellen (siehe 2.2.11.2), ermöglichte die Expression rekombinanter Proteine bei Induktion mit 1 mM IPTG. Mit einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden 1 bis 2 l LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm ca. 2,5 h bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei 600 nm, Spektrophotometer Lambda 35 UV/Vis PerkinElmer, Waltham, USA) inkubiert. Nach IPTG-Induktion wurden die Bakterien weitere 2,5 h geschüttelt und dann präzipitiert. Die Aufreinigung der in den *E. coli* Zellen exprimierten rekombinanten Polypeptide erfolgte mit Hilfe des QIAexpress Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Protokollen des Anbieters. Die Methode nutzt die Bindung des vom pET15b Plasmid kodierten 6x Histidin Epitops an Nickel-Agarose.

2.2.17.2 Affinitätsaufreinigung von Antiseren

Die Affinitätsaufreinigung der Kaninchen-Antiseren der BioGenes GmbH (Berlin) erfolgte mittels Affi-Gel 10 oder 15 (BioRad Laboratories GmbH, München) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wurde das heterolog exprimierte Antigen (2.2.18.1) an die Affi-Gel-Matrix gebunden, diese Lösung auf eine Säule geladen und das Antiserum wiederholt über die Säule gegeben. Auf diese Weise konnten die Antigen-spezifischen Antikörper aus dem Serum gefiltert werden. Die Antikörper wurden abschließend von der Säule eluiert, über Centricon Centrifugal Filter (Millipore GmbH, Schwalbach) den Herstellervorgaben entsprechend konzentriert und bei -70 °C gelagert.

2.2.18 Immunopräzipitation chloroplastidärer Proteine

2.2.18.1 Isolation von Mais-Chloroplasten

Mais-Chloroplasten wurden dem Protokoll von Voelker und Barkan (1995) folgend isoliert.

2.2.18.2 Extraktion von Chloroplastenstroma

Die Chloroplasten wurden durch einen hypotonischen Lysepuffer (nach Ostheimer *et al.*, 2003) und durch mechanische Scherkräfte (wiederholtes Saugen durch eine 21G1½ Kanüle) aufgebrochen. Die Membranbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation bei 45000 rpm abgetrennt und das Stroma, versetzt mit 10% (v/v) Glycerol (Finalkonzentration), bei -70 °C gelagert (Ostheimer *et al.*, 2003).

Chloroplasten-Lysepuffer: 30 mM HEPES-KOH (pH 8); 200 mM Kaliumacetat; 2 mM DTT; 10 mM Magnesiumacetat; 2 µg/ml (w/v) Aprotinin; 2 µg/ml (w/v) Leupeptin; 10 µg/ml (w/v) Pepstatin; 0,8 mM PMSF

2.2.18.3 Immunopräzipitation

Immunopräzipitationen von Proteinen aus Chloroplastenstroma erfolgten wie von Ostheimer *et al.* (2003) beschrieben.

2.2.19 RNA-Immunopräzipitation und Chip-Analyse (RIP-Chip)

Ziel dieser von Schmitz-Linneweber *et al.* (2005b) vorgestellten Methode ist es, die spezifischen RNA-Interaktionspartner von RNA-Bindeproteinen *in vivo* zu ermitteln. Die Abbildung 9 illustriert die Vorgehensweise, die der des Originalprotokolls strikt folgte (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b). Das zu untersuchende Protein wurde immunopräzipitiert (2.2.18.3). Die in diesem Präzipitat befindlichen, mit dem Protein assoziierten Transkripte galt es zu bestimmen. Dazu wurde die RNA aus dem Präzipitat und, zu Vergleichszwecken, aus dem Stroma-Überstand isoliert wie unter 2.2.3.4 beschrieben. Die RNA-Proben wurden differentiell mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 des ASAP RNA Labeling Kit (PerkinElmer, Waltham, USA) markiert wie vom Anbieter empfohlen. Es folgte die Hybridisierung mit einem Microarray, auf den PCR-Produkte, das gesamte Mais-Chloroplasten-Genom repräsentierend, gedruckt wurden (die Mais-Chloroplasten-Microarrays wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alice Barkan, Universität Oregon, USA, zur Verfügung

gestellt). Die Microarrays wurden mit dem Genepix 4000B microarray scanner (MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning) eingelesen und mit der Genepix Pro 6.0 *software* (MDS Analytical Technologies GmbH, Ismaning) ausgewertet wie von Schmitz-Linneweber *et al.* (2005b, 2006) dargestellt. So konnten Transkripte identifiziert werden, die in der Präzipitat-Fraktion im Verhältnis zur Überstand-Fraktion signifikant angereichert waren.

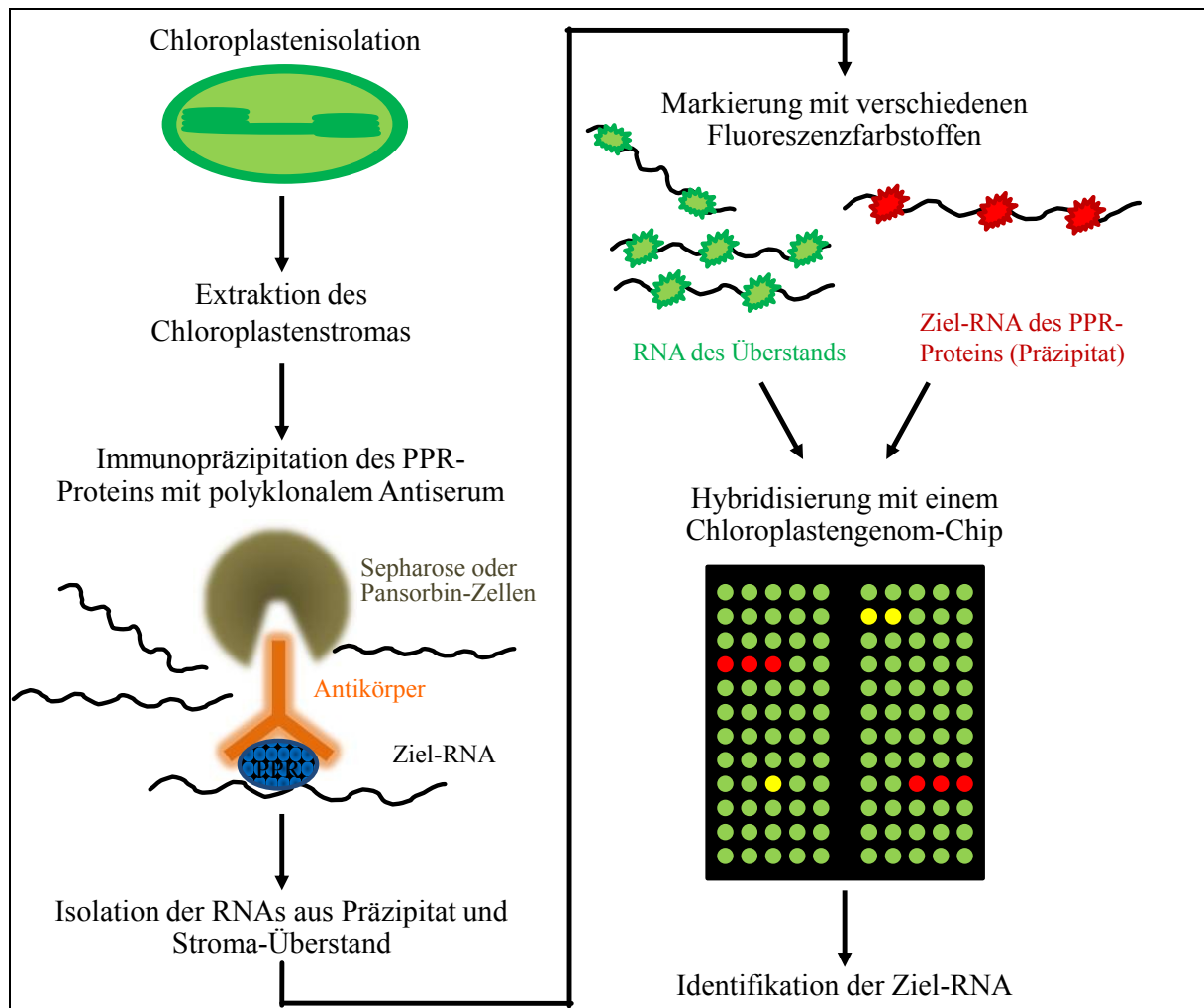


Abb. 9: RNA-Immunopräzipitation und Chip-Analyse (Methode nach Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b)

2.2.20 Slot blot-Analyse

Die RNA aus dem Präzipitat und dem Überstand einer Immunopräzipitation wurde wie unter 2.2.19 beschrieben gewonnen. Diese Proben wurden mit einer *blotting*-Apparatur (96-Well BioDot, BioRad Laboratories GmbH, München) auf eine Nylonmembran (Hybond N-Membran, GE Healthcare, München) übertragen (siehe Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b,

2006). Anschließend wurden die Filter mit Oligonukleotid- oder PCR-Sonden hybridisiert wie im Kapitel 2.2.12.4 dargelegt.

2.2.21 *Run on*-Transkriptionsanalyse

Ergänzend zu einer Northern-Analyse, mit der es nicht möglich ist, Unterschiede in der Transkriptakkumulation auf die Herstellung oder Stabilität dieser Transkripte zurückzuführen, erlaubt die *run on*-Transkriptionsanalyse die Beurteilung der Transkriptionsrate. Dazu wurden intakte Chloroplasten isoliert (2.2.18.1). Der Methode von Mullet und Klein (1987) folgend wurden etwa 5×10^7 Chloroplasten in 45 μ l Puffer D durch mechanischen Stress aufgeschlossen. Es folgte die Inkubation in 50 μ l *run on*-Puffer für 10 min bei 25 °C. Durch Zugabe von 100 μ l Stopp-Puffer wurde die Reaktion beendet. Die nun durch Einbau von [α - 32 P]UTP radioaktiv markierten Transkripte wurden mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und durch Natriumacetat-Ethanol-Fällung (2.2.4) in ein kleineres Volumen überführt. Die Transkripte wurden in Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) bei 58 °C mit einer Membran hybridisiert, auf die ausgewählte PCR-Produkte transferiert wurden. Dieser Transfer erfolgte analog zu der unter 2.2.20 beschriebenen *slot blot*- bzw. *dot blot*-Methode, mit dem Unterschied, dass es hier die Sonden waren, die an einer Hybond N⁺-Membran (GE Healthcare, München) fixiert wurden, pro PCR-Produkt je zweimal 1 μ g DNA. Nach der Hybridisierung wurde die Membran gewaschen wie im Protokoll der Northern-Hybridisierung beschrieben (2.2.12.4) und die Signale konnten mittels PhosphorImager System GS 525 (BioRad Laboratories GmbH, München) detektiert werden (nach Mullet und Klein 1987, modifiziert).

Puffer D:	50 mM Tris-HCl, pH 7; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM KCl; 3 mM β -Mercaptoethanol
<i>run on</i> -Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8); 10 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM ATP; 0,2 mM CTP; 0,2 mM GTP; 0,01 mM UTP; 50 μ Ci [α - 32 P]UTP; 40 U RiboLock RNase Inhibitor; 10 mM β -Mercaptoethanol
Stopp-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8); 25 mM EDTA; 5% (v/v) Sarcosyl

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des in *Arabidopsis* Embryo-essentiellen PPR-Proteins PPR5 in Mais

Es wurde beobachtet, dass zahlreiche chloroplastidäre PPR-Proteine in *Arabidopsis thaliana*, nicht jedoch in *Zea mays*, notwendig für die Embryonalentwicklung sind (Stern *et al.*, 2004). Um zu beleuchten, welche Funktionen solche PPR-Proteine haben könnten, sollte ein in *Arabidopsis* essentielles plastidäres PPR-Protein in Mais analysiert werden. Ein *knockout* des *ppr5*-Gens in *Arabidopsis thaliana* (At4g39620) führt zu Embryoletalität (Cushing *et al.*, 2005). Os02g51480 ist gemäß der POGs Datenbank (<http://pogs.uoregon.edu>) das Orthologe von *ppr5* in *Oryza sativa* (siehe auch Abb. 5). Unter Verwendung dieser Reis-Sequenz konnte in öffentlich zugänglichen Sequenz-Datenbanken mittels BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) das am nächsten verwandte Mais-Gen identifiziert werden, das ein im Chloroplastenstroma lokalisiertes PPR-Protein kodiert (nach Analysen von C. Schmitz-Linneweber und A. Barkan, Beick *et al.*, 2008). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, dieses Protein, im Folgenden mit PPR5 bezeichnet, das wie seine Orthologen in *Arabidopsis* (AtPPR5) und Reis (OsPPR5) ein PPR-Protein des P-Typs mit zehn PPR-Motiven (TPRpred, Karpenahalli *et al.*, 2007) repräsentiert, funktionell zu charakterisieren. Dazu wurden Mutantenanalysen mit einer Bestimmung der *in vivo* mit dem PPR-Protein assoziierten RNA-Moleküle kombiniert.

3.1.1 Identifikation der Ziel-RNA von PPR5

Durch Immunopräzipitation von PPR5 aus Chloroplastenstroma und Analysen der kopräzipitierten RNA sollte *in vivo* die Ziel-RNA von PPR5 identifiziert werden (RIP-Chip-Methode, siehe 2.2.19). Dabei war zu ermitteln, welche plastidäre RNA in PPR5-Präzipitaten gegenüber im Überstand verbleibender RNA signifikant angereichert ist. Eine mögliche unspezifische Präzipitation einzelner Transkripte wurde durch Kontroll-Experimente berücksichtigt, in denen Proteine des Sauerstoff-produzierenden Komplexes (*oxygen evolving complex*, OEC), welche keine RNA binden sollten, immunopräzipitiert wurden. Nach der Hybridisierung des Mais-Plastom-Chips mit den durch verschieden fluoreszierende Farbstoffe markierten RNA-Fractionen wurde das Fluoreszenz-Verhältnis der 250 PCR-Produkte berechnet. Eine maximale Anreicherung in den PPR5-Präzipitaten zeigten Transkripte des *trnG-UCC*-Gens

(siehe Abb. 10A). Somit wurde die tRNA-Glycin als RNA-Interaktionspartner von PPR5 bestimmt.

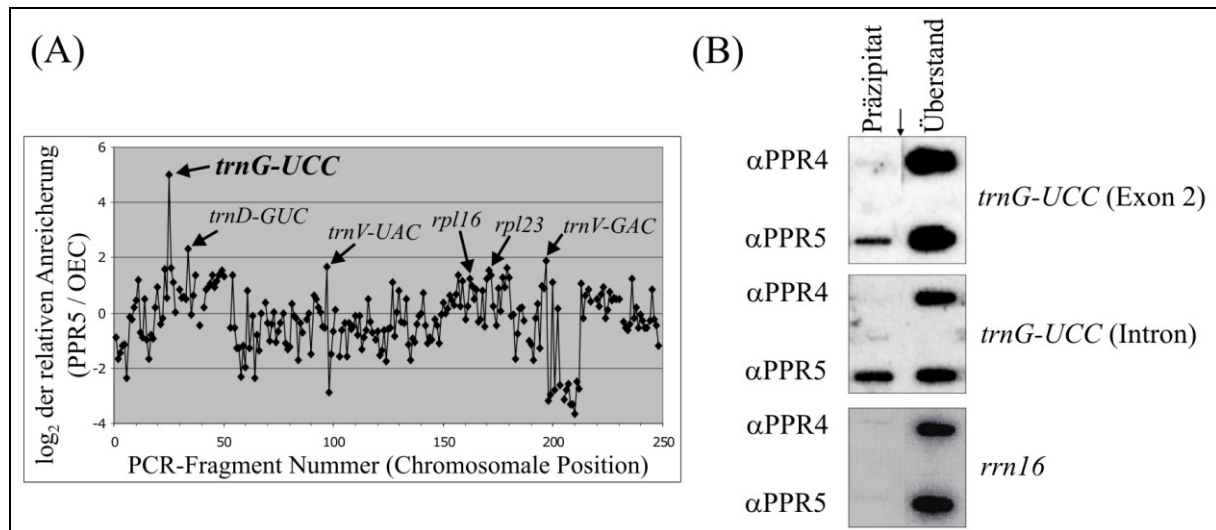


Abb. 10: Identifikation der im Chloroplastenstroma mit PPR5 assoziierten Transkripte

(A) Grafische Darstellung der zusammengefassten RIP-Chip-Ergebnisse. Die Anreicherung der präzipitierten im Vergleich zur im Überstand verbliebenen RNA ist für jedes PCR-Produkt auf dem Chip logarithmisch aufgetragen. Die Werte ergeben sich aus zwei Experimenten mit PPR5-Immunopräzipitationen sowie zwei Kontroll-Experimenten mit OEC-Immunopräzipitationen (Daten von jeweils einem Experiment von C. Schmitz-Linneweber). Die logarithmierten Anreicherungskoeffizienten der Kontrollen wurden von denen von PPR5 subtrahiert. Pro PCR-Produkt waren je fünf technische Replikate auf einem Chip vorhanden, deren Fluoreszenzwerte gemittelt wurden. (B) *Slot blot*-Hybridisierungen mit RNA-Immunopräzipitaten von PPR5 und, zur Kontrolle, PPR4. Es wurden zwei *trnG-UCC*-Sonden und eine *rrn16*-Sonde (Negativkontrolle) mit auf Nylonmembranen immobilisierter Präzipitat- und Überstand-RNA hybridisiert. Der Pfeil kennzeichnet die Entfernung von für diesen Nachweis irrelevanten Proben von allen drei Filtern.

Mittels *slot blot*-Hybridisierungen (2.2.20) wurde bestätigt, dass die tRNA-Glycin in PPR5-RNA-Komplexen spezifisch enthalten war (Abb. 10B). In Kontroll-Experimenten mit α PPR4 wurde die tRNA erwartungsgemäß (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006) nicht immunopräzipitiert. Weiterhin zeigte die Analyse, dass mit der Intron-Sonde in der Präzipitat-Fraktion in Relation zur Überstand-RNA ein deutlich stärkeres Signal als mit der Sonde des Exons 2 detektiert wurde. Das deutete an, dass mit der Intron-Sonde eher als mit der das zweite Exon abdeckenden Sonde die nähere Umgebung der PPR-Bindestelle erfasst sein sollte. Denn durch die Aktivität plastidärer RNasen sinkt die Wahrscheinlichkeit der Präzipitation flankierender Sequenzbereiche mit der Entfernung von der Bindestelle von PPR5. Zudem ließ dieses Ergebnis vermuten, dass mit PPR5 vorwiegend das Intron enthaltende tRNA-Spezies

präzipitiert wurden. Das PPR-Protein sollte demnach mit der ungespleißten RNA assoziiert sein. Um dies zu testen, wurde die immunopräzipitierte RNA in Agarosegelen aufgetrennt und durch Northern-Analysen untersucht (2.2.11 und 2.2.12).

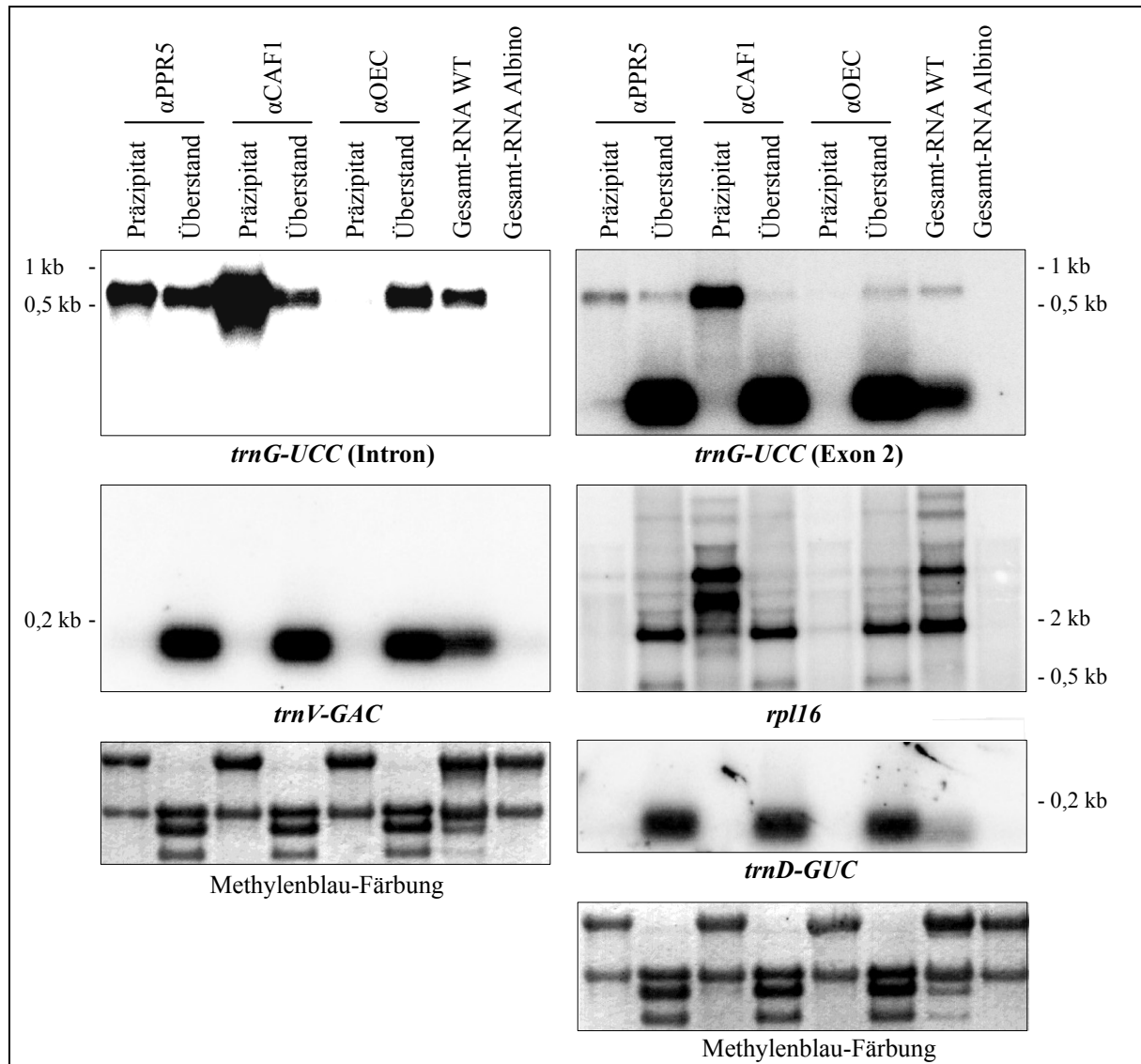


Abb. 11: Northern-Analysen der mit PPR5 koimmunopräzipitierten RNA

Analysen der mit PPR5 assoziierten und der im Stroma-Überstand befindlichen Transkripte durch RNA-Agarosegelelektrophorese und Hybridisierung der auf Nylonmembranen transferierten RNA mit DNA-Sonden. Parallel wurden Kontrollextrakte von CAF1- und OEC-Immunopräzipitationen sowie Mais-Gesamt-RNA aufgetragen. Um eine gleichmäßige Gelelektrophorese zu gewährleisten, wurden die mengenmäßig sehr wenig RNA enthaltenden Präzipitat-Proben mit Gesamt-RNA einer albinotischen Pflanze versetzt. Diese RNA wurde in der letzten Spur zur Kontrolle aufgetragen, sie zeigte keine Hybridisierungssignale. Nach der Hybridisierung wurden die Sonden von den Membranen entfernt und die Filter rehybridisiert. Der ungespleißte Vorläufer der tRNA-Glycin befindet sich gemäß den Northern-Analysen in PPR5-Komplexen, nicht jedoch die reife tRNA.

Wie die Abbildung 11 zeigt, waren tatsächlich ungespleißte, nicht jedoch reife *trnG-UCC*-Transkripte in den PPR5-Immunopräzipitaten nachweisbar. Kontroll-Experimente wurden mit OEC-Präzipitaten, in denen keine RNA-Bestandteile zu erwarten sind, und CAF1-Präzipitaten (CRS2 assoziierter Faktor 1), die als Positivkontrolle fungierten, da CAF1 ein beschriebener Spleißfaktor des Gruppe-IIB-Introns der tRNA-Glycin in Mais ist (Ostheimer *et al.*, 2003), durchgeführt. Des Weiteren wurde auf diese Weise überprüft, ob es sich bei einigen gemäß RIP-Chip-Experiment in der Präzipitat-Fraktion leicht angereichert erscheinenden Transkripten (Abb. 10A) ebenfalls um RNA-Ziele von PPR5 handelt. Doch es wurde keines dieser Transkripte in den mit α PPR5 immunopräzipitierten RNA-Proben detektiert (Abb. 11). Somit offenbarten die auf Immunopräzipitation basierenden Analysen die ungespleißte tRNA-Glycin (UCC) als primäre Ziel-RNA des Proteins PPR5 *in vivo*.

3.1.2 *ppr5*-Mutanten

Für eine detaillierte funktionelle Charakterisierung von PPR5 wurden von Christian Schmitz-Linneweber zuvor identifizierte Mais-Mutanten genutzt. Zwei Mu-Transposon induzierte *ppr5*-Mutantenlinien standen dabei zur Verfügung: albinotische *ppr5-1*-Mutanten mit einer Mu-Element-Insertion im ersten Exon (+241 nt) und blass-grüne *ppr5-2*-Mutanten, bei denen in die *ppr5*-UTR (-55 nt) ein Mu-Transposon inseriert ist. Mutanten beider Linien sterben im Keimlingsstadium. Für die Mutantenanalysen wurden vorwiegend heterozygote Pflanzen, die beide Allele trugen, verwendet. Diese Allele konnten sich nicht komplementieren und der Phänotyp der *ppr5-1* x *ppr5-2*-Keimlinge erschien im Vergleich zu den *ppr5-1*- und *ppr5-2*-Mutanten intermediär (Abb. 12A). Das belegte, dass das beobachtete Chlorophyll-Defizit durch die Transposon-Insertion im *ppr5*-Gen bedingt wurde.

Durch reverse Transkription und PCR-Analysen wurde die Menge der *ppr5*-mRNA in den Mais-Mutanten untersucht. Wie der Abbildung 12C zu entnehmen ist, korrelierte diese mit der phänotypischen Erscheinung. D. h., bei den weißen Keimlingen handelte es sich um *ppr5*-KO-Mutanten, während die hellgrünen *ppr5-2*-Mutanten ein reduziertes, aber nachweisbares *ppr5*-mRNA-Level aufwiesen.

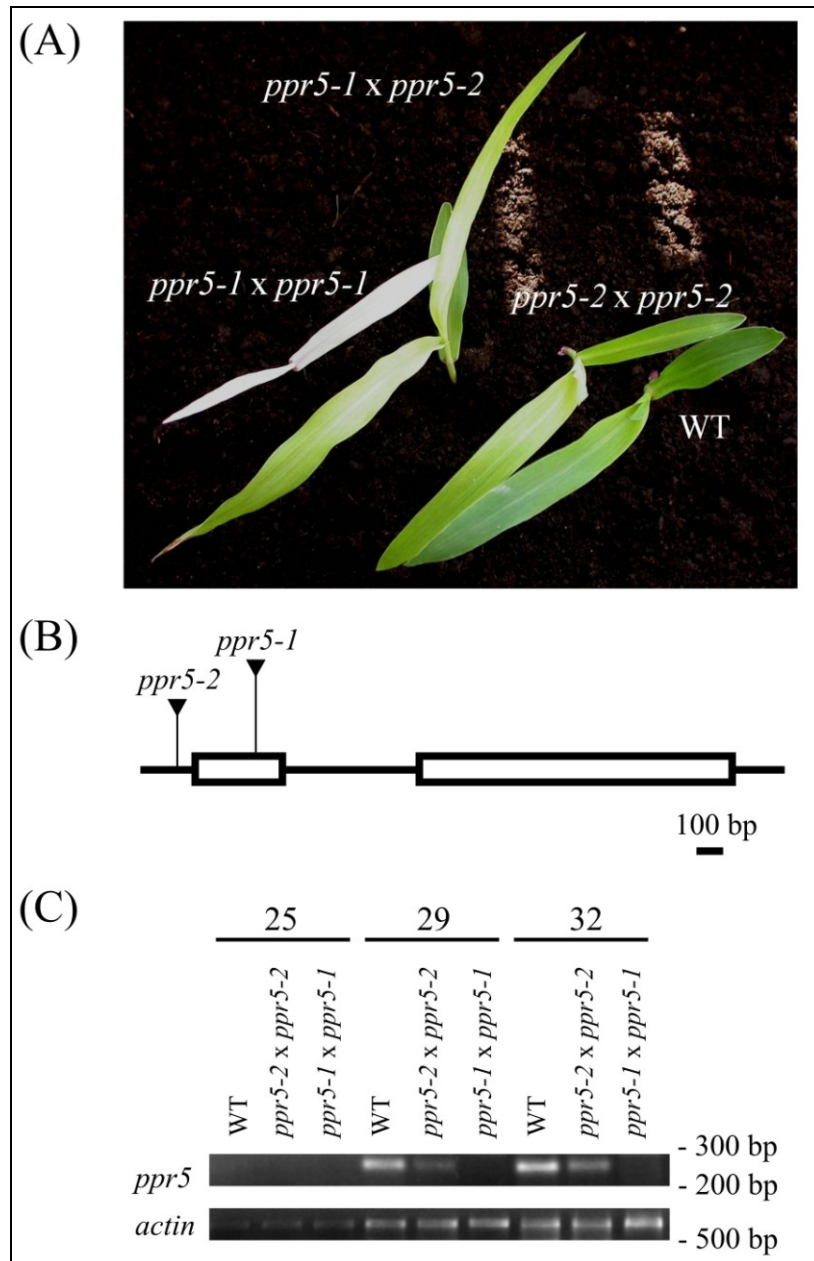


Abb. 12: Mu-Transposon induzierte *ppr5*-Mais-Mutanten

(A) Phänotyp der *ppr5*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Die gezeigten Keimlinge sind ca. 14 Tage alt und wuchsen auf Erde unter Langtagbedingungen bei 27 °C. *ppr5-1*-Mutanten sind albinotisch, *ppr5-2*-Mutanten etwas heller grün als Wildtyp-Keimlinge und heterozygote Kreuzungsmutanten haben einen intermediären Phänotyp. Alle Mutanten sterben noch als Keimlinge. (B) Maßstabsgetreue Darstellung der Lokalisation der Mu-Transposon-Insertionen in *ppr5*. Die Rechtecke symbolisieren Exons, die Linien intronische bzw. UTR-Sequenz. (C) Reverse Transkription und semiquantitative RT-PCR-Analysen zeigen, dass die *ppr5*-mRNA in *ppr5*-Mutanten reduziert ist. Die in der PCR genutzten Oligonukleotide flankieren die Mu-Insertion der *ppr5-1*-Keimlinge im ersten Exon. Die Amplifikation von *actin*-cDNA aus den selben RNA-Proben diente als Kontrolle. Die Kontamination der Proben mit genomischer DNA kann ausgeschlossen werden, da ein Teil der RNA-Proben nach dem DNase-Verdau ohne den Schritt der reversen Transkription in einer PCR auf verbleibende DNA analysiert wurde (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich überspannen die verwendeten *actin*-PCR-Oligonukleotide ein Intron. Es wurden keine das Intron enthaltenden PCR-Amplifikate detektiert.

Aufgrund des Chlorophyll-reduzierten Phänotyps der *ppr5*-Mutanten wurde die Akkumulation der Photosynthesekomplexe ATP-Synthase, Cytochrom b_6f -Komplex sowie Photosystem I und II durch Immunodetektion (2.2.16.4) ausgewählter Untereinheiten analysiert. Wie die Abbildung 13A zeigt, waren alle untersuchten Photosyntheseproteine im Vergleich zum Wildtyp stark, d. h. auf ein Zehntel oder weniger, reduziert. Gleiches galt für die Akkumulation der großen Untereinheit der RuBisCo (Abb. 13A, Ponceau-Färbung). Diese Defekte waren in ähnlicher Form auch bei den Kontrollmutanten *hcf7* und *ppr4* (*ppr4-1* x *ppr4-2*) zu beobachten. Für diese wurde gezeigt, dass die Reduktionen der Komponenten des Photosyntheseapparates im Zusammenhang mit einem globalen Verlust plastidär kodierter Proteine, inklusive der Plastiden-kodierten Untereinheiten der Photosynthesekomplexe, stehen (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Barkan, 1993). Generell gilt, dass die fehlende bzw. reduzierte Synthese von je nur einer Untereinheit der Photosynthesekomplexe auch die verminderte Akkumulation assoziierter Untereinheiten des jeweiligen Komplexes zur Folge hat (Barkan *et al.*, 1995; Barkan, 1998). Eine fehlende bzw. reduzierte plastidäre Translation, wie sie für die *ppr4*- und *hcf7*-Mutanten nachgewiesen wurde (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Barkan, 1993), bedingt entsprechend die Reduktion der plastidär kodierten und damit der analysierten Proteine.

Daraufhin wurde die Reifung ribosomaler RNA in den *ppr5*-Mutanten mittels Northern-Hybridisierung (2.2.12) untersucht. In der Albino-Mutante *ppr5-1* war keine plastidäre rRNA zu detektieren. In den *ppr5-2*- sowie den Kreuzungsmutanten waren die Mengen reifer 16S und 23S rRNA gegenüber dem Wildtyp reduziert, der 16S rRNA-Vorläufer akkumulierte stärker (Abb. 13B). Demnach wird PPR5 für die Prozessierung und Akkumulation ribosomaler RNA benötigt. Da plastidäre rRNA nicht außerhalb der Ribosomen akkumuliert, spiegelt ihre Abundanz die der Ribosomen wider (Williams und Barkan, 2003). Somit ist PPR5 für die Akkumulation oder Assemblierung der plastidären Ribosomen und daraus folgend auch für die Synthese der plastidär kodierten Untereinheiten der Photosynthesekomplexe notwendig. In Anbetracht der unter 3.1.1 beschriebenen Erkenntnis, dass PPR5 *in vivo* mit der tRNA-Glycin assoziiert ist, war im Folgenden zu untersuchen, ob *ppr5*-Mutanten einen veränderten Metabolismus dieser tRNA aufweisen, der den oben dargestellten Defekten zugrunde liegen könnte.

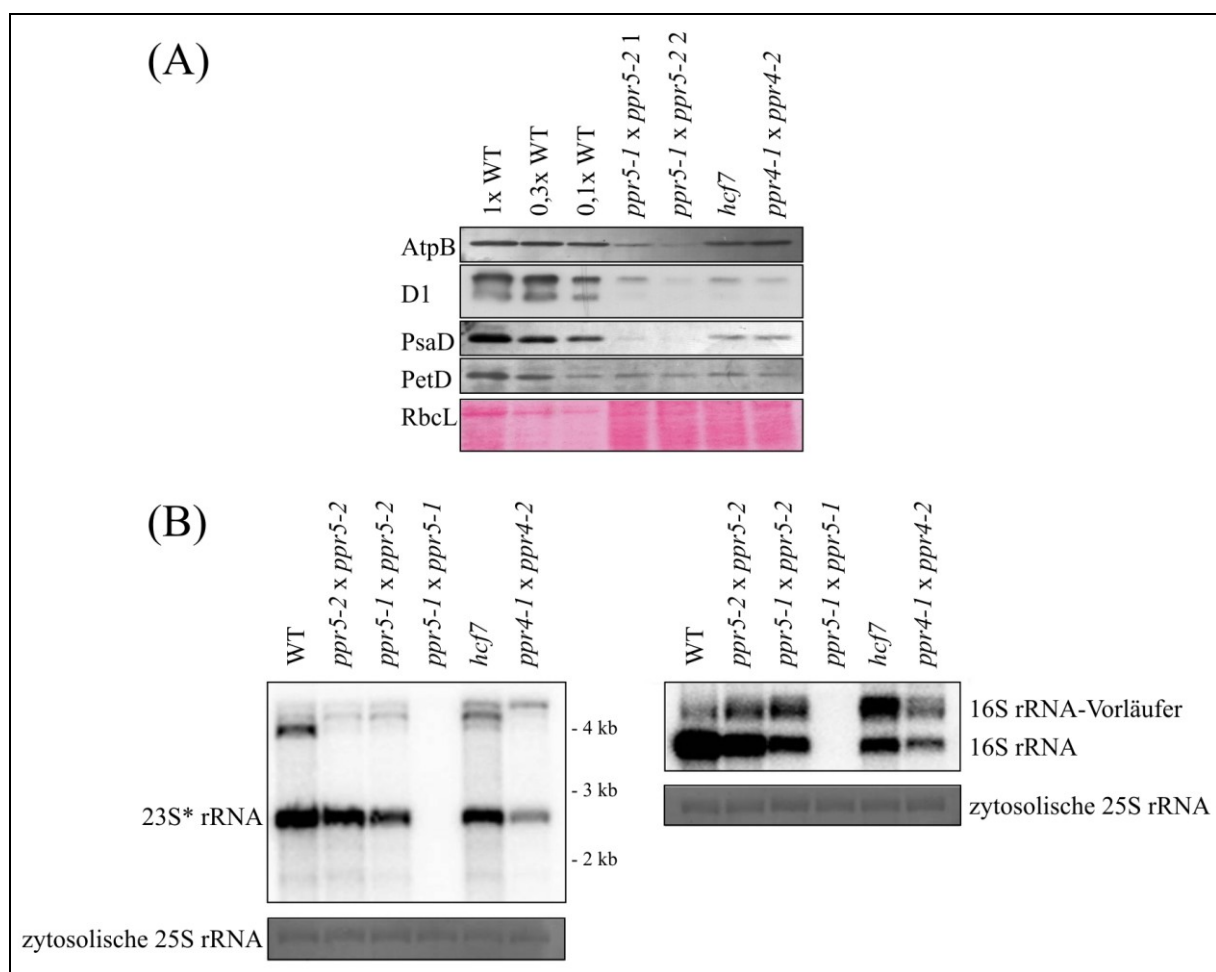


Abb. 13: Verlust der plastidären rRNA und plastidär kodierter Proteine in *ppr5*-Mutanten

(A) Analyse der Akkumulation repräsentativer Untereinheiten der Photosynthesekomplexe ATP-Synthase (AtpB), Cytochrom b_6f -Komplex (PetD) sowie Photosystem I (PsaD) und II (D1) in *ppr5*-Mutanten. Blatt-Gesamt-Protein (Verdünnungen der Wildtyp-Probe wie indiziert) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und durch Immunodetektion analysiert. In *ppr5*-Mutanten sind alle Komplexe zu einem Zehntel oder weniger der im Wildtyp zu detektierenden Mengen reduziert. Die Färbung des Filters mit Ponceau-Lösung demonstriert die gleiche Ladung von Gesamt-Protein. Die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL) ist ebenfalls stark reduziert in *ppr5*-Mutanten. (B) Northern-Analysen der ribosomalen RNA in *ppr5*-Mutanten offenbaren einen Defekt in der Akkumulation und Prozessierung plastidärer rRNA. 0,5 μ g Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit DNA-Sonden für die plastidäre 16S und 23S rRNA hybridisiert. Die für die 23S rRNA genutzte Sonde erlaubte die Detektion eines der zwei in Mais *in vivo* vorhandenen Spaltprodukte der 23S rRNA, gekennzeichnet durch *. Die mittels Methylblau angefärbte Kern-kodierte 25S rRNA diente als Ladekontrolle.

3.1.3 Akkumulation der plastidären tRNA-Glycin in *ppr5*-Mutanten

Durch Northern-Analysen (2.2.12) sollte bestimmt werden, ob PPR5 Einfluss auf das Transkriptmuster der tRNA, mit der das PPR-Protein assoziiert ist, nimmt. Dazu wurde die Akkumulation der tRNA-Glycin in den hypomorphen *ppr5-2*- und den Kreuzungsmutanten untersucht. Die *ppr5-1*-Mutanten waren aufgrund ihrer gravierend gestörten plastidären Translation (siehe oben) für diese Analyse weniger geeignet, da bekannt ist, dass diese Defekte sekundär und unspezifisch den Metabolismus plastidärer RNA beeinflussen (u. a. Jenkins *et al.*, 1997; Williams und Barkan, 2003). Um ggf. sekundär bedingte Defekte bei den hellgrünen *ppr5*-Mutanten als solche zu erkennen, wurden parallel die phänotypisch vergleichbaren Mutanten *hcf7* und *ppr4* analysiert. Blatt-Gesamt-RNA wurde in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die auf eine Nylonmembran transferierte RNA mit einer *trnG-UCC*-Sonde hybridisiert. Die reife tRNA-Glycin (UCC) war in den *ppr5*-Mutanten nahezu nicht nachweisbar, während die ebenfalls plastidär kodierte Isoakzeptor-tRNA-Glycin (GCC) in ähnlicher Menge wie in den Kontrollmutanten akkumulierte (Abb. 14A).

Um die Akkumulation der ungespleißten *trnG-UCC*-Transkripte zu analysieren, wurden die RNA-Extraktionen in Agarosegelen aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit mehreren *trnG-UCC*-Exon- und -Intron-Sonden hybridisiert. Wieder war die Reduktion der reifen tRNA zu erkennen, weiterhin zeigten diese Experimente, dass auch die ungespleißten Vorläufer in den *ppr5*-Mutanten reduziert vorlagen. Insbesondere in den Kreuzungsmutanten, die das UTR- und das KO-Allel von *ppr5* trugen, waren nur sehr schwache Hybridisierungssignale detektierbar. Die Kontrollmutanten *ppr4* und *hcf7* zeigten eine mit der des Wildtyps vergleichbare Akkumulation der tRNA-Glycin (Abb. 14B). Das niedrige Level ungespleißter tRNA ließ erkennen, dass PPR5 für die Synthese oder Stabilität dieses Transkripts benötigt wird und nicht oder nicht nur für die Generierung der reifen tRNA. Interessanterweise wurde mit Sonden, die die 5'-Sequenz des *trnG-UCC*-Gens abdeckten (Exon 1 und 5'-Bereich des Introns), eine ca. 430 nt umfassende RNA-Spezies detektiert (Abb. 14B, untere Hybridisierungen). Sie war nicht mit Sonden über das Exon 2 oder den 3'-Bereich des Introns zu erfassen. Das legte nahe, dass es sich bei dieser RNA um ein Transkript handelte, das mit dem ersten Exon begann und im Intron endete, ein potentiell Abbauprodukt der Vorläufer der tRNA (Abb. 14B, Skizze). Durch die Detektion mit einzelsträngigen Oligonukleotid-Sonden konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um eine *antisense*-RNA handelte. Dieses kurze Transkript war ebenso in Wildtyp-Pflanzen nachweisbar, schien aber in *ppr5*-Mutanten, besonders klar erkennbar in *ppr5-2*-Keimlingen, im Verhältnis zum ungespleißten Vorläufer deutlich stärker zu akkumulieren.

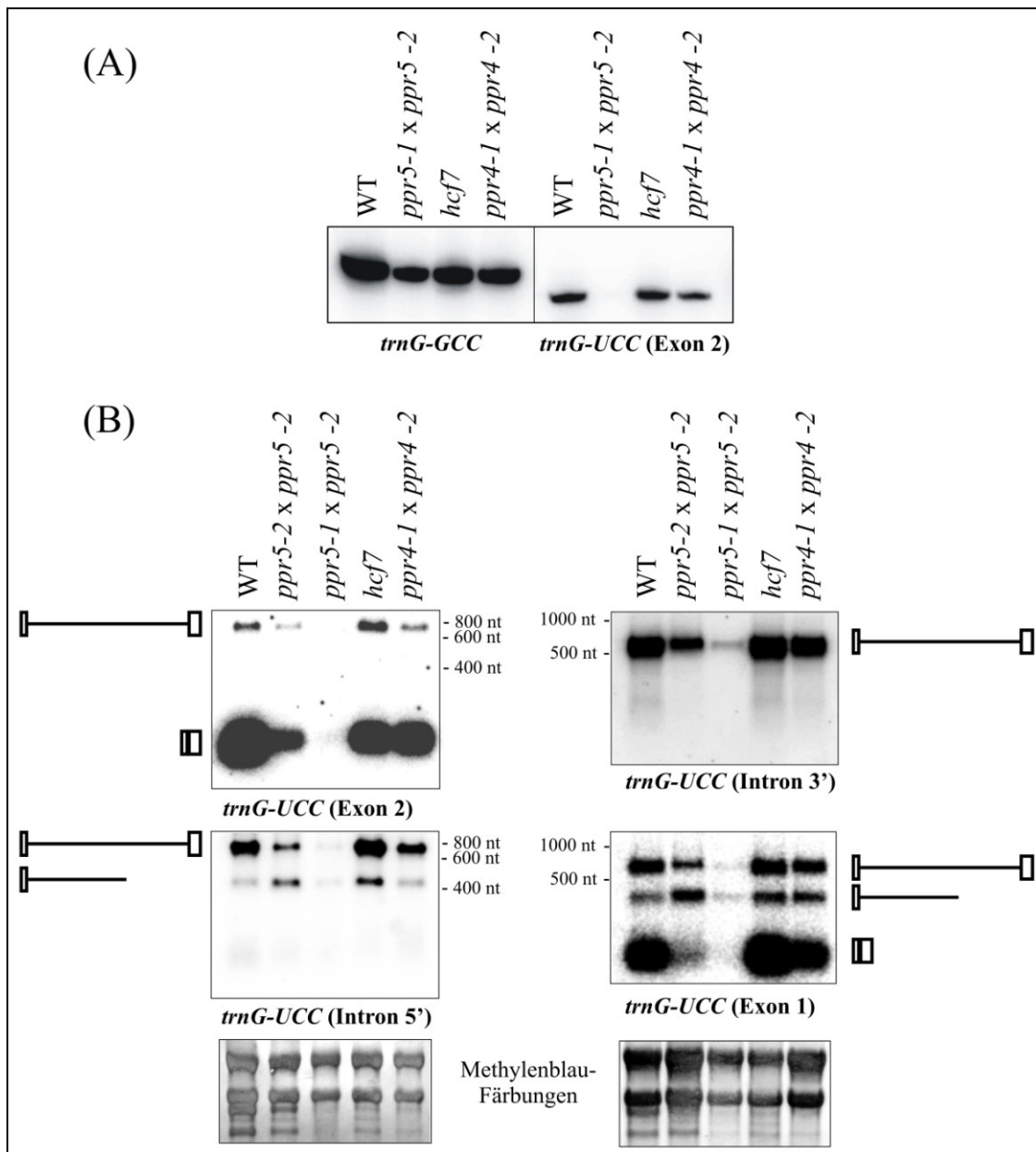


Abb. 14: Northern-Analysen der tRNA-Glycin-Akkumulation in *ppr5*-Mutanten

(A) 4 µg Gesamt-RNA aus Mutanten- und Wildtyp-Keimlingen wurde in 20% Polyacrylamidgelen aufgetrennt und, transferiert auf Nylonmembranen, mit den genannten tRNA-Oligonukleotid-Sonden hybridisiert. Die reife tRNA-Glycin (UCC) fehlt in *ppr5*-Mutanten, während die Isoakzeptor-tRNA-Glycin (GCC) akkumuliert. (B) Je 4 µg Gesamt-RNA von Keimlingen der genannten Genotypen wurde in 1,2% Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt und nach Transfer auf Membranen mit verschiedenen *trnG-UCC*-Sonden hybridisiert. Es handelte sich um Oligonukleotid-Sonden bzw. bei der Intron 5'-Sonde um ein radioaktiv markiertes PCR-Produkt. Nach einer ersten Hybridisierung wurden die Sonden entfernt und die Filter rehybridisiert. Die Methylenblau-Färbungen demonstrieren eine gleichmäßige Beladung. Die Zeichnungen links und rechts von den Filtern skizzieren die detektierten Transkripte (von unten nach oben: reife tRNA, verkürztes Transkript, das nur mit den 5'-Sonden nachgewiesen wurde, und ungespleißter Vorläufer). Die reife und die ungespleißte tRNA-Glycin liegen in *ppr5*-Mutanten reduziert vor.

Die Akkumulationen von Transkripten der Gene *rpl14*, *rpl33*, *trnfM-CAU* und *trnD-GUC* (Daten nicht gezeigt) sowie *trnA-UGC*, *trnI-GAU*, *trnV-UAC*, *trnL-UAA* und *trnK-UUU* (siehe 3.2.7, Abb. 30) wurden zur Kontrolle in *ppr5*-Mutanten und Wildtypen vergleichend analysiert, wobei jeweils keine Unterschiede in der Transkriptabundanz zu detektieren waren.

3.1.4 Analyse des tRNA-Glycin-Spleißens in *ppr5*-Mutanten

Die oben genannten Northern-Analysen der tRNA-Glycin deuteten nicht unmittelbar auf einen Spleißdefekt in den *ppr5*-Mutanten, da bei charakterisierten PPR-Mutanten mit plastidären Spleißdefekten das reife Transkript reduziert ist, ungespleißte Transkripte jedoch nicht fehlen, sondern stärker als in Wildtypen akkumulieren (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Falcon de Longevialle *et al.*, 2008). Dennoch war, aufgrund der Interaktion mit einem Primärtranskript, welches ein Intron aufweist, eine Beteiligung von PPR5 am Spleißprozess denkbar. Um die Relation von gespleißtem zu ungespleißtem Transkript beurteilen zu können, wurden *poisoned primer extension*-Analysen (siehe 2.2.13) durchgeführt. Da die *ppr5-1* × *ppr5-2*-Mutanten gemäß den Northern-Untersuchungen nur sehr geringe, kaum zu detektierende Mengen der tRNA-Glycin (UCC) aufwiesen (Abb. 14), wurden die weniger stark betroffenen *ppr5-2*-Mutanten für diese Analyse genutzt. In die reverse Transkription wurden das im zweiten Exon von *trnG-UCC* gelegene Oligonukleotid trnGPPE und als Didesoxynukleotid ddCTP gegeben. Fungierte ungespleißter tRNA-Vorläufer als Matrize, wurde dieses Abbruchnukleotid an der Position des 31. Nukleotids der synthetisierten cDNA eingebaut. Komplementär zur gespleißten tRNA sollte eine drei Nukleotide kürzere cDNA generiert werden (Abb. 15A).

In *ppr5-2*-Mutanten waren beide cDNA-Spezies zu detektieren, was belegte, dass vorhandene Vorläufer-Moleküle durch Spleißen in reife tRNA überführt wurden. Nichtsdestotrotz war das Verhältnis von Produkten nicht gespleißter zu denen gespleißter RNA im Vergleich mit dem Wildtyp zugunsten der ungespleißten etwas verschoben (Abb. 15B). Daraus war zu folgern, dass die *ppr5-2*-Mutanten zwar keinen gravierenden Spleißdefekt aufwiesen, PPR5 jedoch möglicherweise eine untergeordnete Rolle für den Spleißprozess spielen könnte.

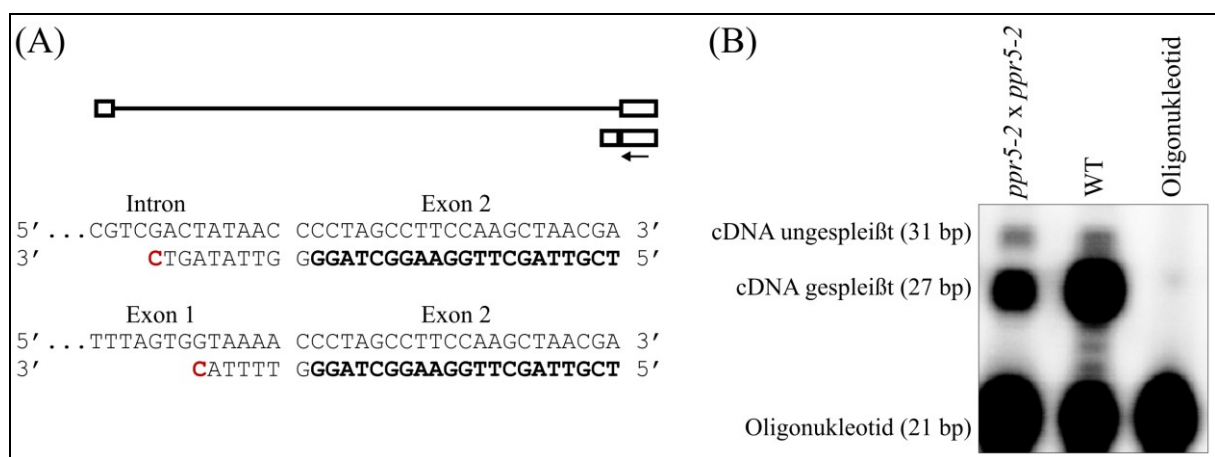


Abb. 15: *Poisoned primer extension*-Analyse der tRNA-Glycin (UCC) in *ppr5*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

(A) Skizze des experimentellen Vorgehens mit den vorhergesagten cDNA-Produkten bei einer Verlängerung des Oligonukleotids (fett gedruckt) komplementär zur ungespleißten (oben) oder gespleißten tRNA (unten). Der Einbau eines ddCTP führt zur Termination, das entsprechende Cytosin ist jeweils rot gekennzeichnet. (B) Gel-elektrophoretische Auftrennung im denaturierenden Polyacrylamidgel der mittels reverser Transkription generierten cDNA-Produkte und des radioaktiv markierten Oligonukleotids. Das Oligonukleotid und die Verlängerungsprodukte gespleißter und ungespleißter Transkripte sind links gekennzeichnet. Gemäß der Analyse ist in *ppr5*-Mutanten das Verhältnis der gespleißten zur ungespleißten tRNA zugunsten der ungespleißten verschoben.

3.1.5 Vergleichende Kartierung von tRNA-Enden

Wie unter 1.1.3 beschrieben, erfordert die Reifung von Transkripten auch eine Prozessierung der 3'- und 5'-Enden sowie deren Stabilisierung. Um zu überprüfen, ob PPR5 die Prozessierung der Enden der tRNA-Glycin beeinflusst, wurden diese Transkripttermini in *ppr5*-Mutanten und zum Vergleich in Wildtyp-Pflanzen und *ppr4*-Kontrollmutanten kartiert. Die Methoden, die dabei Anwendung fanden, basierten auf der reversen Transkription spezieller RNA-Ligationsprodukte und deren Amplifikation mittels PCR wie unter 2.2.8 dargestellt (Abb. 7, Abb. 16).

Die Kartierung der Transkriptenden mittels Zirkularligation zeigte, dass weder die Prozessierung des 5'- noch die des 3'-Endes der tRNA-Glycin in *ppr5*-Mutanten signifikant verändert war. Die ermittelte Sequenz stimmte mit der kodierten überein (Abb. 16A). Gegenüber der annotierten Gensequenz (Maier *et al.*, 1995) war zusätzlich die Nukleotidfolge CCA zwischen den ligierten 5'- und 3'-Enden nachzuweisen. Dieses Trinukleotid wird im Rahmen der tRNA-Reifung an die 3'-Enden von plastidären tRNA-Molekülen geheftet (Vogel und Hess, 2001). Im Fall der tRNA-Glycin (UCC) ist diese Nukleotidfolge bereits genomisch

kodiert (Maier *et al.*, 1995; Vogel und Hess, 2001). Somit war unklar, ob sie hier infolge eines zusätzlichen Prozessierungsschrittes vorhanden war. Letztendlich besaßen sowohl Wildtyp als auch *ppr4*- und *ppr5*-Pflanzen dieses 3'-Ende.

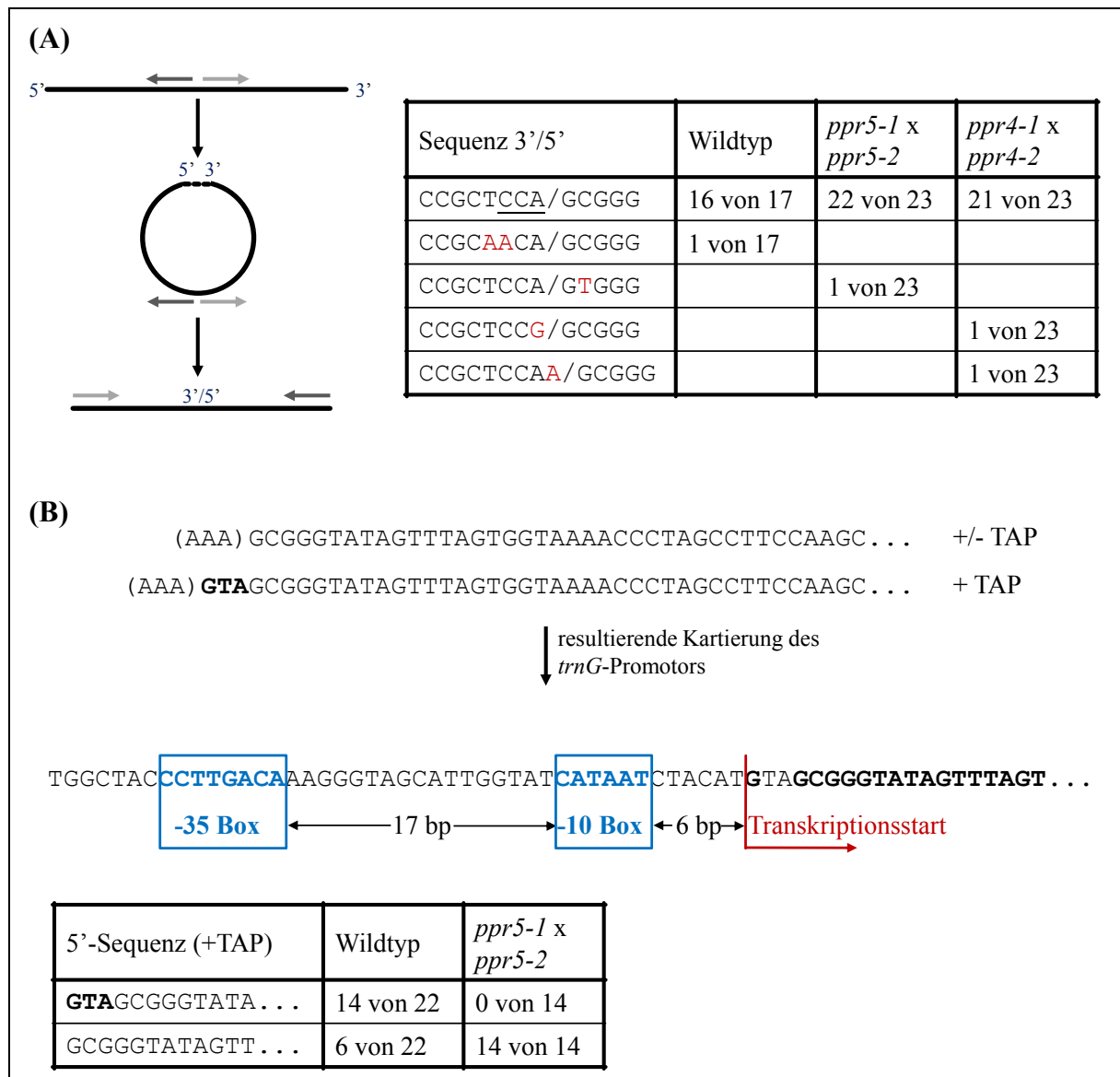


Abb. 16: Kartierung der Enden der tRNA-Glycin (UCC) mittels Zirkularisierung und linker-Ligation

(A) Bestimmung der 3'- und 5'-Transkripttermini der tRNA durch RNA-Zirkularisierung, die sich anschließende reverse Transkription und PCR. Links ist das experimentelle Vorgehen skizziert. Die Pfeile kennzeichnen die für die PCR verwendeten Oligonukleotide und ihre Positionen. Das reverse Oligonukleotid (dunkles Grau) wurde für die reverse Transkription genutzt. Die Tabelle rechts gibt die nachgewiesenen Sequenzen und ihre Repräsentation durch sequenzierte Klone im Verhältnis zu allen Klonen von Wildtyp, *ppr5*- und *ppr4*-Mutanten wieder. Der Schrägstrich in der angegebenen Sequenz trennt dabei das 3'- und das 5'-Ende. Die erwartete Sequenz ist in der obersten Zeile notiert. Das unterstrichene Triplet CCA befindet sich an den 3'-Enden plastidärer tRNA-Moleküle und wurde auch hier nachgewiesen. Die Mehrheit der Klone aller RNA-Extrakte zeigt die erwartete Sequenz. Einige wenige Klone enthalten kleinere Sequenzunterschiede, sie sind rot gekennzeichnet.

(B) Kartierung des primären 5'-Endes durch Behandlung mit TAP und RNA-*linker*-Ligation. Die meisten Sequenzen enthielten PolyA-Anhänge (symbolisiert durch (AAA)). Sie sind wahrscheinlich artifiziell, bedingt durch die notwendige Zugabe von ATP während der Ligation. Solche PolyA-Anhänge wurden auch von anderen Experimentatoren gezeigt (u. a. Vogel und Hess, 2001). In den mit TAP behandelten Ansätzen des Wildtyps wurden drei Nukleotide längere Transkripte nachgewiesen, die in den nicht mit TAP versetzten Proben nicht vorkamen. Der so kartierte Transkriptionsstart (rot gekennzeichnet) zeigt eine Transkription durch die PEP. In der 5'-flankierenden Sequenz des *trnG-UCC*-ORF finden sich Nukleotid-Elemente, die perfekt einem bakteriellen PEP-Promotor entsprechen (blau). Primäre Transkriptenden wurden überwiegend im Wildtyp detektiert, nicht jedoch in *ppr5*-Mutanten.

Die Bestimmung des 5'-Endes der tRNA-Glycin mittels RNA-*linker*-Ligation bestätigte die Ergebnisse der Zirkularligation. Die Sequenzen einzelner Klone zeigten Substitutionen, Insertionen oder Deletionen von Nukleotiden, die wahrscheinlich auf Fehler im Nukleotideinbau der Enzyme in der reversen Transkription oder PCR zurückzuführen sind. Reproduzierbare, signifikante Unterschiede in den tRNA-5'-Enden von Mutanten und Wildtypen wurden jedoch nicht identifiziert (Daten nicht gezeigt). In Parallelansätzen, die zuvor mit der *tobacco acid phosphatase* (TAP) behandelt wurden, konnten allerdings zusätzliche, und somit aller Wahrscheinlichkeit nach primäre, Transkriptenden mit einer TGA-Nukleotidfolge vor der annotierten Gensequenz nachgewiesen werden (Abb. 16B). Der so identifizierte Transkriptionsstart deutete auf die Nutzung eines Bakterientyp-Promotors und eine Transkription durch die plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase PEP. Interessanterweise war dieses 5'-Ende der tRNA-Glycin mehrheitlich in den TAP-Ansätzen der Wildtyp-RNA-Präparationen zu detektieren (14 von 22 Klone, siehe Abb. 16B), in RNA-Proben von *ppr5*-Mutanten war es dagegen nicht nachzuweisen.

3.1.6 Bestimmung der *trnG*-Transkription durch *run on*-Analyse

Sowohl die Analyse des Spleißprozesses als auch die der tRNA-Glycin-Enden zeigten zwar kleinere Unterschiede in *ppr5*-Mutanten und Wildtypen, als primärer Defekt in *ppr5*-Pflanzen stellte sich jedoch eine stark reduzierte Akkumulation des ungespleißten tRNA-Glycin-Vorläufers dar (3.1.3). Als mögliche Ursache war denkbar, dass PPR5 für die Stabilität dieser RNA, für die Transkription des *trnG*-Gens oder für beide Prozesse benötigt werden könnte. Intuitiv sollte PPR5 als PPR-Protein eher ein RNA-Bindeprotein sein (siehe Einleitung 1.2). Auch die durch Immunopräzipitation nachgewiesene direkte Assoziation mit einer definierten RNA (3.1.1) sprach weniger für eine Funktion als Transkriptionsfaktor. Allerdings könnte der Nachweis primärer Transkriptenden der tRNA-Glycin in den Wildtyp-Extrakten, jedoch nicht

in den aus mutantern Material isolierten Chloroplasten (3.1.5) als Hinweis auf einen Transkriptionsdefekt interpretiert werden. Um diese Frage experimentell zu klären, wurde die Transkription des *trnG-UCC*-Gens in isolierten Chloroplasten aus *ppr5*-Pflanzen und Wildtypen durch *run on*-Analyse determiniert. Zum Vergleich wurde die Transkription eines anderen plastidären tRNA-Gens, das ein Intron enthält, herangezogen (*trnV-UAC*). Wie die in der Abbildung 17 gezeigte Hybridisierung belegt, wurde der *trnG-UCC*-Lokus in *ppr5*-Mutanten transkribiert. Das Verhältnis der *run on*-Transkripte von *trnG-UCC* im Vergleich zu denen von *trnV-UAC* in Mutanten und Wildtypen war mit 1,7 und 2,6 ähnlich. Um auszuschließen, dass Hybridisierungssignale von kontaminierenden mitochondrialen oder nukleären Extrakten stammen oder unspezifisch sein könnten, wurden auch eine mitochondriale (*cox1*), eine Kerngen-spezifische (*actin*) und eine Vektor-spezifische (pDrive) Membran-gebundene Sonde mit den radioaktiven Transkripten hybridisiert. Mit diesen Sonden wurden keine Signale detektiert. Somit war zu schlussfolgern, dass PPR5 nicht für eine Initiation der Transkription des plastidären *trnG-UCC*-Gens benötigt wird.

In den Northern-Analysen wurde ein verkürztes ungespleißtes Transkript von ca. 430 nt detektiert (Abb. 17). Dabei könnte es sich sowohl um ein unvollständig synthetisiertes Transkript als auch um ein Degradationsprodukt handeln. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden zwei *trnG-UCC*-Sonden, eine, die das gesamte Gen umfasste, und eine Exon 2-Sonde, mit *run on*-Transkripten hybridisiert. Die Exon 2-Sonde detektierte das 430 nt lange Transkript in der Northern-Hybridisierung nicht (Abb. 14) und somit sollten, wenn eine unvollständige Transkription zu der verstärkten Akkumulation des verkürzten Transkripts in *ppr5*-Mutanten führte, deutlich schwächere Signale mit dieser Sonde und den *run on*-Transkripten der *ppr5*-Extrakte nachzuweisen sein. Das war nicht der Fall, das Verhältnis der mit beiden Sonden detektierten Hybridisierungssignale in Mutanten und Wildtyp-Pflanzen war vergleichbar (Abb. 17). Somit schien ein frühzeitiger Transkriptionsabbruch nicht zu den verkürzten tRNA-Molekülen zu führen.

Als stichhaltigste Erklärung für die in *ppr5*-Mutanten beobachtete reduzierte Akkumulation der ungespleißten tRNA-Glycin bietet sich demnach eine Funktion von PPR5 in der Stabilisierung dieses tRNA-Vorläufers an. Das identifizierte Degradationsprodukt impliziert, dass im Intron der tRNA eine Schnittstelle für eine Endonuklease vorkommt, welche durch PPR5 geschützt werden könnte. Das Fehlen des PPR-Proteins könnte einen Abbau der ungespleißten tRNA durch verstärkt auftretende endonukleolytische Spaltung zur Folge haben.

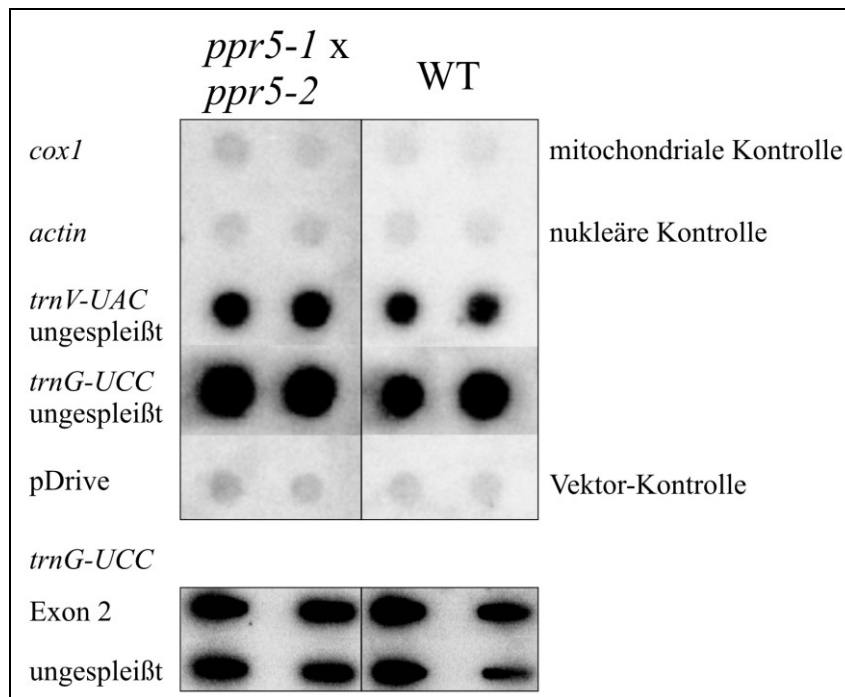


Abb. 17: Run on-Transkriptionsanalyse der *trnG-UCC*-Transkription in *ppr5*-Mutanten

In einem *run on*-Ansatz wurde in isolierten Chloroplasten von *ppr5*-Mutanten bzw. Wildtyp-Keimlingen (WT) die Transkription unter Einbau radioaktiven UTPs fortgeführt. Die RNA wurde extrahiert und mit Membran-gebundenen Sonden hybridisiert. So wurde die Transkription der Gene *trnG-UCC* und *trnV-UAC*, die jeweils ein Gruppe-II-Intron kodieren, bestimmt. Das Verhältnis der Transkription beider Loci wurde berechnet. Es ist in *ppr5*-Mutanten (1,7) und Wildtypen (2,6) ähnlich. Somit zeigen die Mutanten keinen Transkriptionsdefekt. Die Hybridisierungen mit einer mitochondrialen und einer nukleären Sonde blieben ohne Signal, was belegt, dass die Chloroplasten-Extrakte frei von Kontamination waren. Ein weiteres Kontrollexperiment war die Hybridisierung mit dem leeren Vektor pDrive, der für die Klonierung der verwendeten Sonden genutzt wurde. Die Hybridisierung mit einer das gesamte *trnG-UCC*-Gen überspannenden Sonde im Vergleich zu der mit einer Sonde über das zweite Exon zeigt, dass die Transkription nicht vorzeitig in *ppr5*-Pflanzen abbricht.

3.1.7 Detektion eines 3'-Degradationstranskripts durch *primer extension*-Analyse

Die Spaltung der tRNA-Glycin-Vorläufer durch eine Endonuklease sollte zu zwei verkürzten RNA-Fragmenten führen. Ein 5'-Abbauprodukt wurde mittels Northern-Analyse detektiert (Abb.14), ein entsprechendes 3'-Fragment war so jedoch nicht nachweisbar. Eine Ursache dafür könnte eine Instabilität dieses Degradationsproduktes sein. Deshalb wurde die sensitivere *primer extension*-Methode für einen Nachweis genutzt. Dazu wurde ein Oligonukleotid, das vor der möglichen Schnittstelle, innerhalb dieses 3'-Abbauproduktes, binden sollte (Position +454 bis +473), radioaktiv markiert und in eine reverse Transkription eingesetzt. Komplementär zu dem potentiell vorhandenen 3'-Degradationstranskript sollte das Oligonukleotid um etwa zehn bis 30 Nukleotide verlängert werden. Um die Größenabschätzung der im

Polyacrylamidgel aufgetrennten Syntheseprodukte zu vereinfachen, wurde ein weiteres Oligonukleotid von 71 nt markiert und aufgetragen.

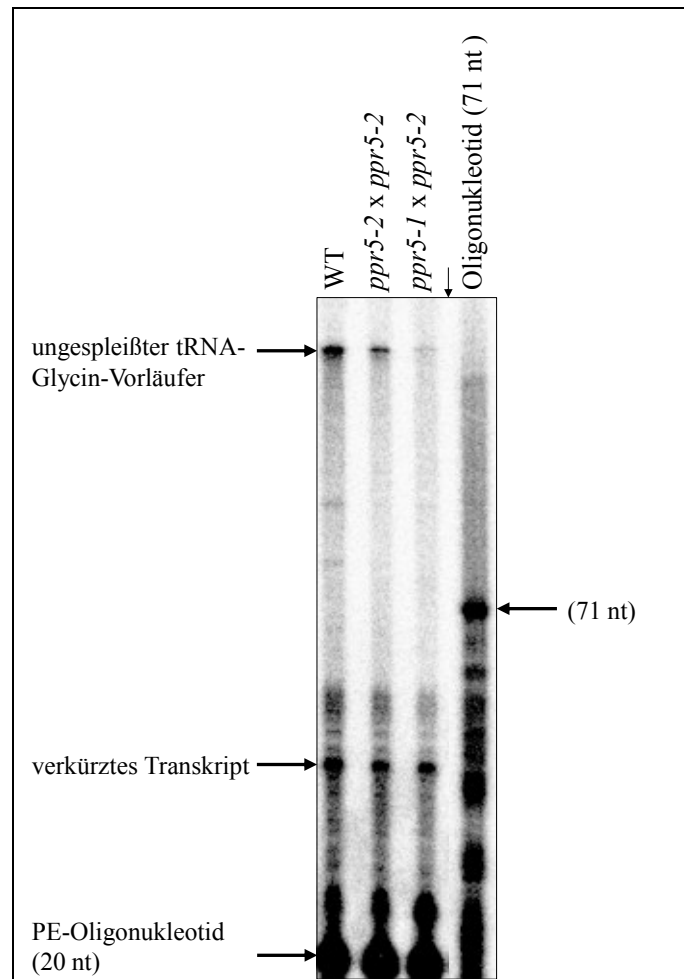


Abb. 18: *Primer extension*-Analyse der tRNA-Glycin (UCC) zum Nachweis eines 3'-Degradations-transkripts

Auftrennung der durch eine *primer extension*-Analyse gewonnenen cDNA aus *ppr5*- und Wildtyp-Pflanzen (WT) in einem 15%igen Polyacrylamidgel. Das für die reverse Transkription gewählte radioaktiv markierte Oligonukleotid ist 20 nt lang und komplementär zu den Positionen +454 bis +473 des tRNA-Glycin-Introns. Zur Größenabschätzung des kürzeren Signals wurde ein endmarkiertes 71 nt langes Oligonukleotid genutzt. Der senkrechte Pfeil kennzeichnet die Entfernung einer Spur. Es sind in allen Proben zwei Produkte zu detektieren, das eine ist vermutlich komplementär zum ungespleißten tRNA-Vorläufer und das andere zu einem verkürzten Transkript, das im Intron endet und wahrscheinlich ein Degradationsprodukt der tRNA-Glycin darstellt.

Es wurden zwei deutliche Signale für *primer extension*-Produkte identifiziert (Abb. 18). Bei dem längeren Produkt handelte es sich wahrscheinlich um das reverse Transkript der intakten tRNA-Glycin-Vorläufer, die cDNA läuft nur eine kurze Strecke in das Gel ein, wie es von

Molekülen dieser Länge (473 nt) zu erwarten wäre. Das kürzere Produkt wies eine Transkriptspezies nach, deren 3'-Ende weniger als 50 Nukleotide *upstream* der Position des gewählten *primer extension*-Oligonukleotids lokalisiert ist. Das Signal zeigte eine leichte Unschärfe. Es waren mehrere schwächere Banden in der Umgebung zu detektieren, was durch eine RNA-Degradation bzw. unvollständige reverse Transkription während des Experiments bedingt sein könnte oder aber einen exonukleolytischen Abbau des 3'-tRNA-Fragments reflektiert. Diese Signal-Unschärfe ermöglichte kaum eine exakte Quantifizierung der *primer extension*-Produkte, zudem war das Gesamtsignal der Wildtyp-Probe stärker. Nichtsdestotrotz war auch anhand dieses Experiments eine reduzierte Akkumulation der intakten Vorläufer der tRNA-Glycin in den *ppr5*-Mutanten deutlich erkennbar.

Das kurze *primer extension*-Produkt könnte anhand seiner Länge das gesuchte 3'-Fragment repräsentieren. Der Nachweis von 3'- und 5'-Degradationsprodukten der tRNA-Glycin, welche in *ppr5*-Mutanten zudem im Verhältnis stärker akkumulieren, die niedrige Abundanz des ungespleißten Vorläufers in den Mutanten, die nicht durch Transkriptionsdefekte, sondern durch seinen Abbau bedingt wird, und die Assoziation von PPR5 mit der ungespleißten tRNA-Glycin (UCC) in Chloroplasten *in vivo* lassen sich mit einer Schutzfunktion von PPR5 als RNA-Bindeprotein einer Endonuklease-sensitiven Stelle im Intron der plastidären tRNA optimal erklären.

3.2 Analyse paraloger PPR-Proteine in *Zea mays*: PPR2, PPR50 und PPR51

PPR-Proteine sind ubiquitär in Eukaryoten verbreitet, doch in höheren Pflanzen sind sie außerordentlich abundant (Lurin *et al.*, 2004). Es wird derzeit vermutet, dass PPR-Proteine in Pflanzen mit einem oder wenigen organellären RNA-Zielen interagieren und so die korrekte Expression organellärer Gene ermöglichen (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Es ist jedoch noch weitgehend unklar, wie die Spezifität für ihre Bindepartner definiert wird (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Unter der Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen der Phylogenie einzelner PPR-Proteine und ihrer Interaktion mit bestimmten Transkripten bestehen könnte, sollten im Rahmen dieser Arbeit nahe verwandte PPR-Proteine betrachtet werden. Dazu wurden erste Analysen mit PPR-Mutanten für die nächsten Verwandten von PPR5 in Mais durchgeführt.

3.2.1 Identifikation von mit *ppr5* phylogenetisch nah verwandten PPR-Genen in Mais

Der Bestimmung der Paralogen von *ppr5* lag der von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ian Small (Universität Western Australia, Australien) erstellte Stammbaum aller PPR-Gene in *Arabidopsis* und Reis zugrunde (siehe in der Abb. 5 gezeigter Ausschnitt). Dieser Verwandtschaftsrekonstruktion folgend wurden drei orthologe Paare von PPR-Genen identifiziert, welche die Schwestergruppe von *Atppr5* und *Osppr5* bilden (At3g53170 und Os03g02430, At5g48730 und Os06g07550 sowie At3g06430 und Os03g19650). Die drei Reis-Sequenzen wurden für einen Datenbankvergleich mit Maisgenomdaten mittels BLAST-Algorithmus genutzt (Altschul *et al.*, 1997). Es wurden für zwei dieser PPR-Gene putative Mais-Orthologe in öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken identifiziert. Bei dem einen handelte es sich um *ppr2*, welches gemäß den Analysen von Williams und Barkan ein PPR-Protein kodiert, das für die plastidäre Translation in Mais benötigt wird (Williams und Barkan, 2003).

Die zweite Sequenz wurde in einem längeren *contig* identifiziert (MaizeGDB ID ZmGSStuc111204.4124.2) und es wurde ein Genmodell anhand eines *alignments* mit den Genen aus *Arabidopsis* und Reis erstellt. Das Mais-Gen wurde mit *ppr50* bezeichnet. Die Nukleotid-identität der kodierenden Sequenz mit der von Os03g02430 betrug 82%. Die Abbildung 19 zeigt ein *alignment* der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der putativen Orthologen von PPR50 aus *Arabidopsis*, Reis und Mais, wobei insbesondere die hochgradige Ähnlichkeit der Mais- und Reis-Sequenzen deutlich wird. Wie auch PPR5, PPR2 sowie das im folgenden vorgestellte PPR-Protein PPR51, besteht PPR50 fast ausschließlich aus PPR-Motiven und dem N-terminalen Signalpeptid, dessen Sequenz sich in Mais, Reis und *Arabidopsis* stärker unterscheidet.

Für das dritte PPR-Gen konnten nur sehr kurze Fragmente mit deutlicher Ähnlichkeit in den Sequenzdatenbanken gefunden werden (MaizeGDB ID 61762871 und 27224830). Sie dienten als Ausgangspunkt für das Design von PCR-Oligonukleotiden. Mittels PCR konnten etwa 2 kb der Sequenz eines Mais-Gens amplifiziert werden (Abb. 20A), welches mit *ppr51* bezeichnet wurde. Im bekannten kodierenden Bereich war die Übereinstimmung der Nukleotidsequenz mit Os06g07550 86%.

Erstellung eines *alignments* mit dem ClustalW-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994). Die grauen Balken kennzeichnen die PPR-Motive gemäß TPRpred (Karpenahalli *et al.*, 2007). Der Grad der Übereinstimmung ist unter der Sequenz durch Symbole (siehe Legende) bzw. durch Farbkodierung im *alignment* angegeben (rot: identische, grün: sehr ähnliche, blau: ähnliche Positionen). Die N-Termini der Sequenzen (etwa die ersten 60 Aminosäurepositionen in Mais) zeigen kaum Ähnlichkeit. Hierbei sollte es sich um die Signalpeptide handeln, die den Import der Proteine in die Chloroplasten vermitteln.

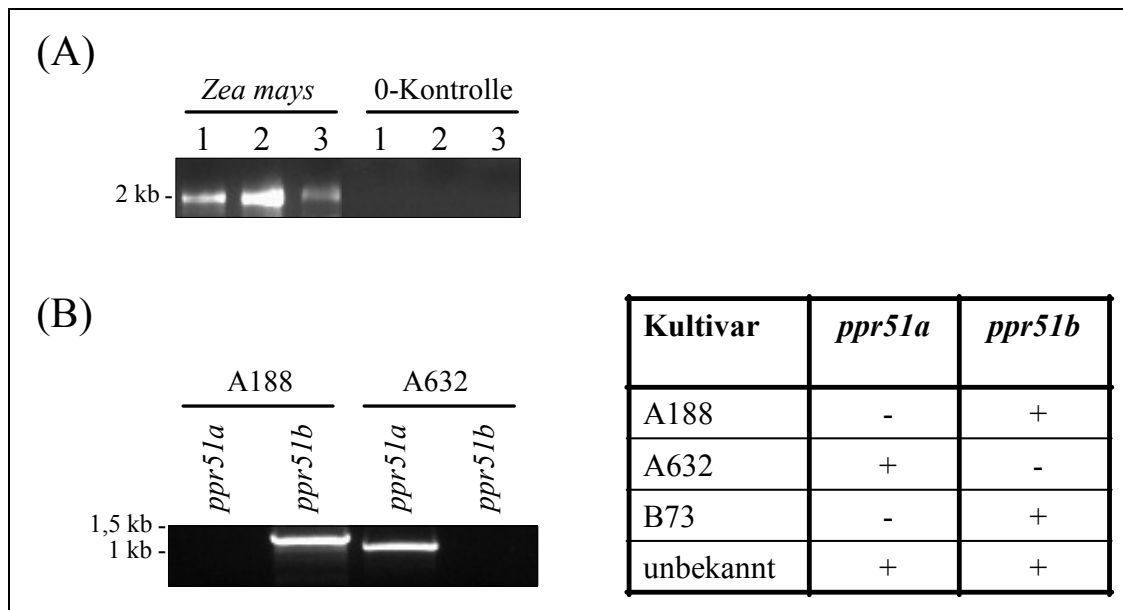


Abb. 20: Amplifikation von etwa 2 kb eines PPR-Gens aus Mais (*ppr51*)

(A) Mittels PCR-Technik konnten 2 kb der Sequenz eines PPR-Gens aus *Zea mays* gewonnen werden. Es wurden drei verschiedene Kombinationen von Oligonukleotiden, die sich von den in Sequenzdatenbanken identifizierten Mais-Sequenzen ableiteten, verwendet (1: *ppr51Afor1* und *ppr51Drev2*, 2: *ppr51Afor2* und *ppr51Drev1*, 3: *ppr51Afor2* und *ppr51Drev2*, siehe Tab. 3). In Negativkontrollen ohne Mais-DNA wurden die Produkte nicht amplifiziert. (B) Die Sequenzierung der unter (A) amplifizierten Produkte zeigte zwei Sequenzen, die sich vor allem im zweiten Intron unterschieden. Die beiden Sequenzen wurden mit *ppr51a* und *ppr51b* bezeichnet. Es wurden Oligonukleotide für die unterschiedlichen Sequenzbereiche entwickelt. Die Sequenz *ppr51a* ist mit Extrakten von Mais-Pflanzen des Kultivars A188 und von unbekanntem genetischem Hintergrund zu amplifizieren, die Sequenz *ppr51b* dagegen kommt in den Kultivaren B73 und A632 sowie der Pflanze, von der der genetische Hintergrund unklar ist, vor. Somit handelt es sich bei *ppr51a* und *ppr51b* um zwei Allele eines Gens, die Pflanze mit beiden Allelen sollte heterozygot sein.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte offenbarte interessanterweise die Identifikation zweier *ppr51*-Allele, die mit *ppr51a* und *ppr51b* bezeichnet wurden. Diese waren durch zwei Insertionen bzw. Deletionen von 209 nt und 31 nt im zweiten Intron sowie durch Einzelnukleotid-Substitutionen deutlich voneinander zu differenzieren, die abzuleitende Aminosäuresequenz beider Allele unterschied sich jedoch nur in vier von 371 bekannten Positionen. Es wurden PCR-Oligonukleotide entwickelt, die die spezifischen Unterschiede beider Sequenzen erfassten und so war nachzuweisen, dass die Allele in verschiedenen Mais-Kultivaren vorkommen. So enthalten Mais-Pflanzen der Sorten B73 und A188 ausschließlich das Allel *ppr51b*, während *Zea mays* A632 ausschließlich das Allel *ppr51a* kodiert (Abb. 20B und weitere, nicht gezeigte Daten). Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass es

sich bei *ppr51a* und *ppr51b* um Allele eines Gens und nicht um zwei verschiedene, durch eine kürzliche Genduplikation entstandene Gene handelt.

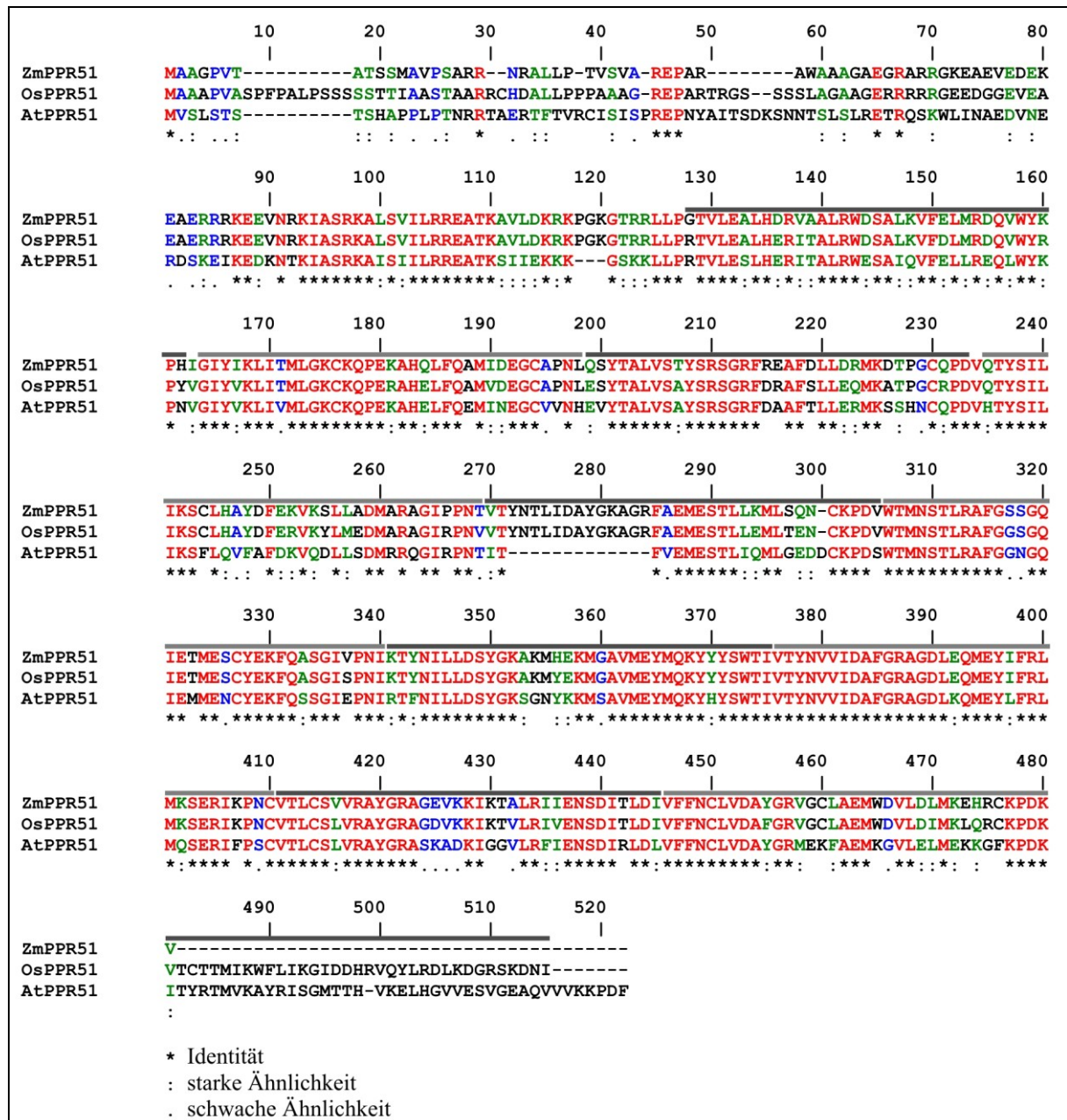


Abb. 21: *Alignment* der PPR51-Aminosäuresequenzen aus Mais, Reis und *Arabidopsis*

Erstellung eines *alignments* mit dem ClustalW-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994). Die grauen Balken kennzeichnen die PPR-Motive gemäß TPRpred (Karpenahalli *et al.*, 2007). Der Grad der Übereinstimmung ist unter der Sequenz durch Symbole (siehe Legende) bzw. durch Farbkodierung im *alignment* angegeben (siehe Abb. 19). Die Sequenz von PPR51 aus Mais ist nicht vollständig bekannt, sodass vermutlich ca. 35 Aminosäuren und damit das letzte PPR-Motiv in diesem *alignment* fehlen. Für die Analyse wurde die Sequenz des *Zea mays*-Allels *ppr51b* verwendet.

Ebenso wie es für *ppr50* dargelegt wurde (Abb. 19), zeigt das *alignment* der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *ppr51*, Os06g07550 und At5g48730 eine hochgradige Übereinstimmung (Abb. 21).

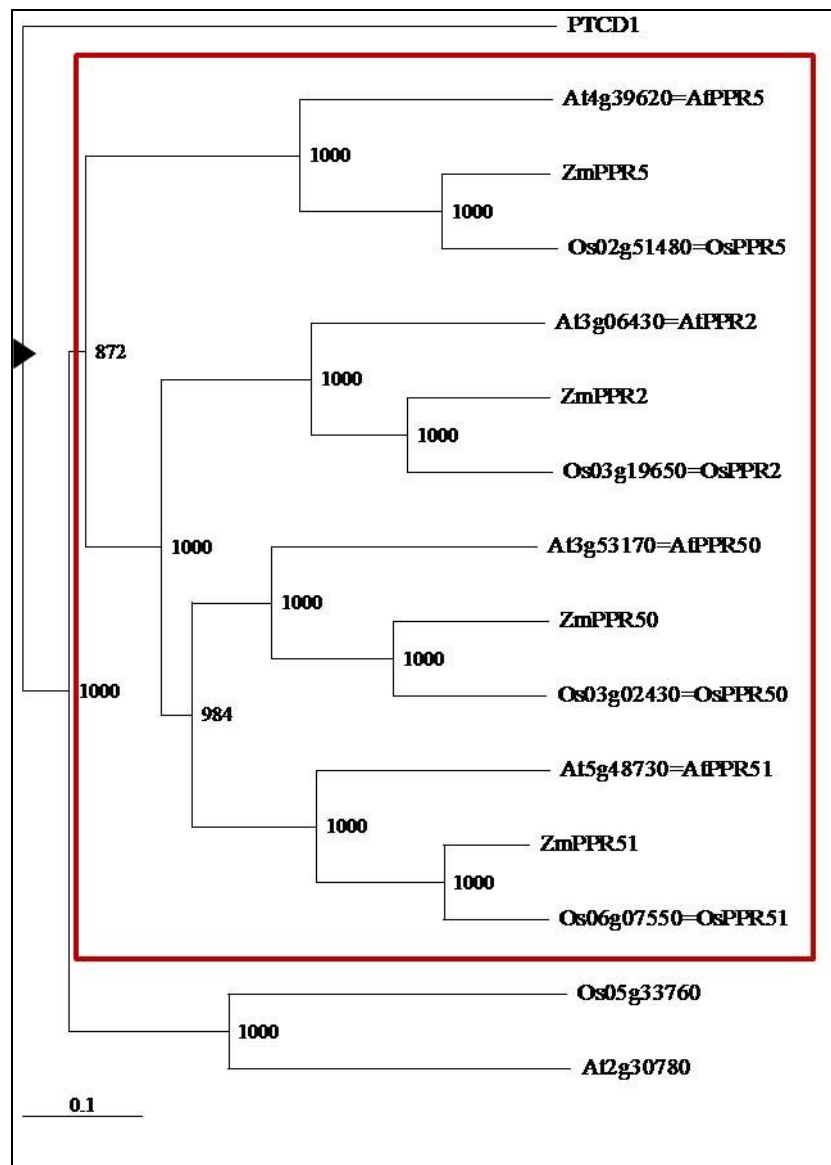


Abb. 22: Phylogenetische Analyse der Homologen von PPR5

Die Homologen von PPR5 aus Mais, Reis und *Arabidopsis* und das humane PPR-Protein PTCD1 (GenBank BC103502.1) als Außengruppe wurden mit ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) aliniert. Nach der *neighbor joining*-Methode (Saitou und Nei, 1987) wurde ein Phylogramm erstellt und mittels TreeView (Page, 1996) visualisiert. Die Länge der Zweige korreliert mit den Aminosäureaustauschen, der Balken unten links kennzeichnet 0,1 Austausche pro Position. An den Knotenpunkten sind die *bootstrap*-Werte in Promille von 100 Wiederholungen notiert. Das Dreieck symbolisiert die Position der Wurzel bei der Definition von PTCD1 als Außengruppe. Der rote Rahmen umfasst die PPR5-Orthologen und seine Schwestergruppe, bestehend aus den PPR2-, PPR50- und PPR51-Orthologen.

Um die Orthologie der identifizierten Mais-Gene *ppr2*, *ppr50* und *ppr51* mit den Reis-PPR-Genen, welche die nächsten Verwandten von *Osppr5* sind, zu belegen, wurden sie mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul *et al.*, 1997) mit der kompletten Sequenz des Reis-Genoms verglichen. Die Reis-Gene Os03g02430, Os06g07550 bzw. Os03g19650 waren dabei diejenigen, für die eine maximale Homologie bestimmt wurde. Ebenso wird die Orthologie durch ein mittels *neighbor joining*-Verfahren erstelltes Phylogramm aus den abgeleiteten Proteinsequenzen gestützt (Abb. 22). Für diese Analyse wurden neben den Genen *ppr5*, *ppr2*, *ppr50*, *ppr51* und ihren putativen Reis- und *Arabidopsis*-Orthologen zwei weitere, gemäß nicht publizierten Ergebnissen von Small *et al.* nahe verwandte PPR-Gene und ein humanes PPR-Gen als Außengruppe verwendet. Wie die Abbildung 22 zeigt, sind der phylogenetischen Rekonstruktion folgend *ppr50* und *ppr51* am nächsten miteinander verwandt und zusammen mit *ppr2* bilden sie die Schwestergruppe von *ppr5*. Somit waren diese PPR-Gene bzw. die von ihnen kodierten Proteine Gegenstand weiterer Analysen.

Tab. 1: Vorhersage der subzellulären Lokalisation der PPR-Proteine PPR2, PPR50 und PPR51 aus *Zea mays*, *Oryza sativa* und *Arabidopsis thaliana*

	<i>Zea mays</i>		<i>Oryza sativa</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	TargetP	Predotar	TargetP	Predotar	TargetP	Predotar
PPR2	0,887 plastidär (RC 2)	0,93 plastidär	0,684 plastidär (RC 3)	0,50 plastidär	0,926 plastidär (RC 1)	0,95 plastidär
PPR50	0,966 plastidär (RC 1)	0,49 möglicherweise plastidär	0,970 plastidär (RC 1)	0,33 möglicherweise plastidär	0,888 andere Lokalisation	0,97 andere Lokalisation
PPR51	0,725 plastidär (RC 4)	0,83 plastidär	0,927 plastidär (RC 1)	0,97 plastidär	0,800 plastidär (RC 3)	0,87 plastidär

Die Vorhersagen wurden mit den Programmen TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) und Predotar (Small *et al.*, 2004) unter Einstellung der Standardbedingungen für pflanzliche Sequenzen getroffen. Das Resultat wird dabei mit einem Wahrscheinlichkeitswert angegeben. RC (*reliability class*) steht für die von TargetP getroffene Einschätzung der Zuverlässigkeit der Einstufung, wobei 1 die beste und 5 die schlechteste Zuverlässigkeit kennzeichnet. Die Sequenzanalysen der Signalpeptide prognostizieren für alle Proteine außer AtPPR50 einen Import in die Chloroplasten.

Bei PPR2, PPR50 und PPR51 handelt es sich um P-Typ-PPR-Proteine, die jeweils elf PPR-Motive aufweisen (TPRpred, Karpenahalli *et al.*, 2007, unter Vorbehalt für PPR51 wegen des unvollständigen 3'-Bereichs). PPR5 (siehe 3.1) und PPR2 (Williams und Barkan, 2003) sind plastidär lokalisiert. Auch für PPR50 und PPR51 ergeben *in silico* Analysen der N-Termini der Sequenzen mit den Algorithmen TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) und Predotar (Small

et al., 2004) eine Lokalisation in den Chloroplasten (siehe Tabelle 1). Für das Orthologe von PPR50 in *Arabidopsis thaliana* wird interessanterweise jedoch von beiden genutzten Programmen kein Import in die Plastiden vorhergesagt. Ob dies mit der Ungenauigkeit der Programme (Small *et al.*, 2004) zu begründen ist oder ob AtPPR50 tatsächlich keine Funktion in den Plastiden ausübt, wird im Zusammenhang mit den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit zu diskutieren sein.

3.2.2 PPR-Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, führen Mutationen in zahlreichen PPR-Genen in *Arabidopsis thaliana* zu Embryoletalität (Lurin *et al.*, 2004; Cushing *et al.*, 2005). Auch in *Atppr5* (Cushing *et al.*, 2005; siehe 3.1) und in *Atppr2* (EMB 2750 des Syngenta SeedGenes Projekts, www.seedgenes.org; Tzafrir *et al.*, 2003) rufen Transfer-DNA-Insertionen Embryoletalität hervor. Dementsprechend sollte untersucht werden, welche Auswirkungen Mutationen in den Genen *Atppr50* und *Atppr51* haben. Dazu wurden T-DNA-Insertionslinien der Sammlung des Salk Institutes (La Jolla, USA; Alonso *et al.*, 2003) analysiert.

In der Linie SALK_049786 konnte die Lokalisation eines T-DNA-Elements im zweiten Exon des Gens *Atppr50*, nach der Position +1292 nt im zehnten von elf PPR-Motiven, bestätigt werden. Von der Linie wurden zunächst 18 Samen ausgebracht, die alle keimten. Die Pflanzen wurden genotypisiert. Dabei wurden in einem PCR-Ansatz drei Oligonukleotide verwendet, zwei Gen-spezifische und ein T-DNA-spezifisches (siehe Abbildung 23A). Das erlaubte parallel die Detektion der T-DNA-Insertion in *Atppr50* und die Amplifikation des Wildtyp-Fragments. Es konnten unter den Pflanzen alle drei Genotypen identifiziert werden: Wildtypen, heterozygote T-DNA-Träger und homozygote Insertionsmutanten (Abb. 23B). Die Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert und zeigten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Entwicklung oder Fertilität. Durch Selbstung wurden homozygote T-DNA-Insertionslinien gewonnen, die in ihrer phänotypischen Erscheinung nicht von Nachkommen der Wildtyp-Geschwister zu differenzieren waren (Abb. 23C).

In den Linien SALK_143438 und SALK_061241 konnten T-DNA-Elemente im ersten bzw. dritten Exon des Gens *Atppr51* nachgewiesen werden. Von 18 Samen der Linie SALK_143438 keimten 14 Pflanzen, von 21 der Linie SALK_061241 waren es 16. Homozygote T-DNA-Insertionsmutanten wurden bei der Genotypisierung der Pflanzen beider Linien nicht nachgewiesen. Das ließ vermuten, dass das Ausschalten des *Atppr51*-Gens durch Insertionsmutagenese zu Embryoletalität führt. Deshalb wurden die Samenschoten von selbst-

befruchteten Heterozygoten und, zur Kontrolle, von Wildtyp-Pflanzen beider Linien auf Hinweise auf einen Abbruch der Embryonalentwicklung untersucht. In Schoten der Heterozygoten der Linie SALK_143438 waren zahlreiche weiße und, mit zunehmender Reife der Schoten, vertrocknete und stark eingefallene Samen nachzuweisen (Abb. 24A und B). Statistisch gesehen sollten 25% der Nachkommen der heterozygoten Pflanzen homozygote Insertionsmutanten sein. Eine Auszählung der abortiven Samen ergab 26% weiße bzw. vertrocknete Samen in den Samenschoten der heterozygoten Pflanzen, während bei den Wildtyp-Pflanzen 4% der Samen vertrocknet waren (Abb. 24C). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die homozygote Insertion mit einem abortiven Phänotyp einhergeht.

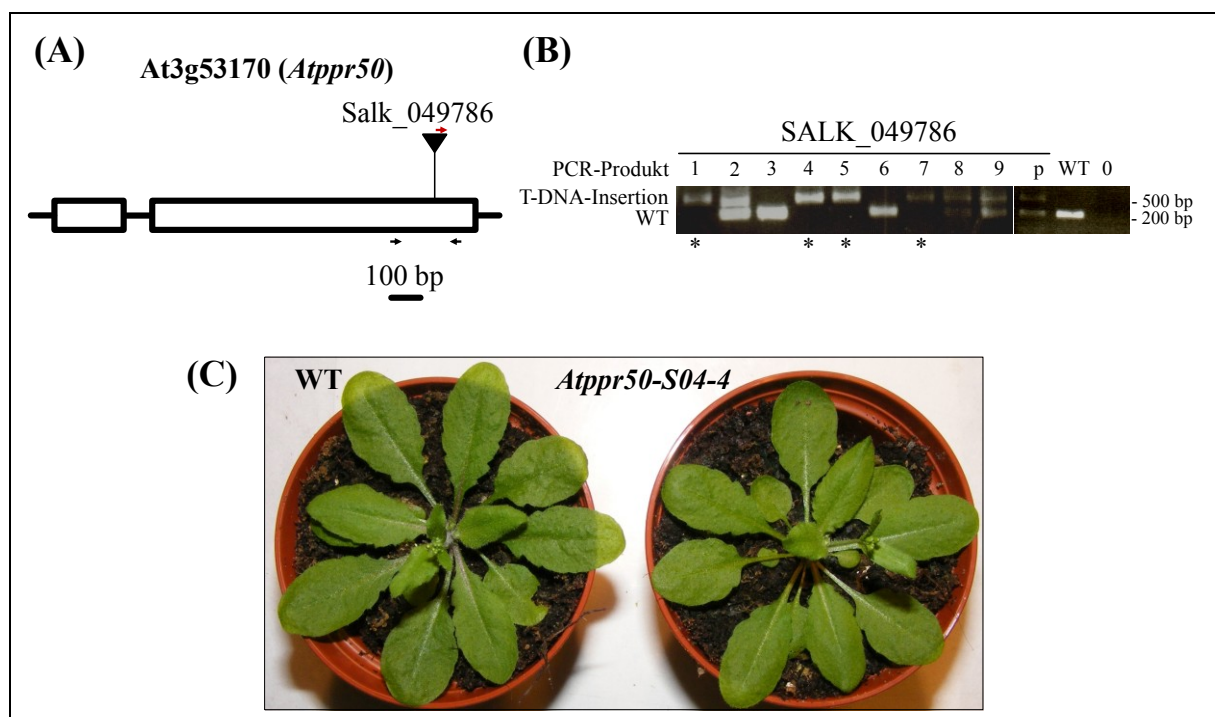


Abb. 23: Isolation einer *Arabidopsis-ppr50*-T-DNA-Mutante

(A) Schematische Darstellung der Gen-Organisation von *Atppr50* und der T-DNA-Lokalisation. Die Position der für die Genotypisierung genutzten Oligonukleotide ist durch Pfeile gekennzeichnet, wobei das T-DNA-Oligonukleotid rot dargestellt ist. Rechtecke symbolisieren Exons, Linien das Intron und UTR-Sequenzen. Der Balken rechts gibt den Maßstab wieder. (B) Genotypisierung von neun der 18 ausgebrachten Pflanzen der Linie SALK_049786 in einer PCR mit drei verschiedenen Oligonukleotiden. Es sind alle drei Genotypen nachzuweisen, Wildtypen (3 und 6), heterozygote (2, 8 und 9) und homozygote Insertionsmutanten (1, 4, 5 und 7, gekennzeichnet durch *). In einer Probe, die Extrakte aller Pflanzen enthält (p), sind Signale für die T-DNA in *Atppr50* und das Wildtyp-Allel, in einem bekannten Wildtyp (WT) nur das Wildtyp-Signal und in der Negativkontrolle (0) kein PCR-Produkt zu detektieren. (C) Phänotyp der *Atppr50*-Mutanten (*Atppr50-S04-4*, Nachkomme der Pflanze 4 der Linie SALK_049786) im Vergleich zum Wildtyp (Ökotyp Columbia), gewachsen auf Erde unter Langtagbedingungen.

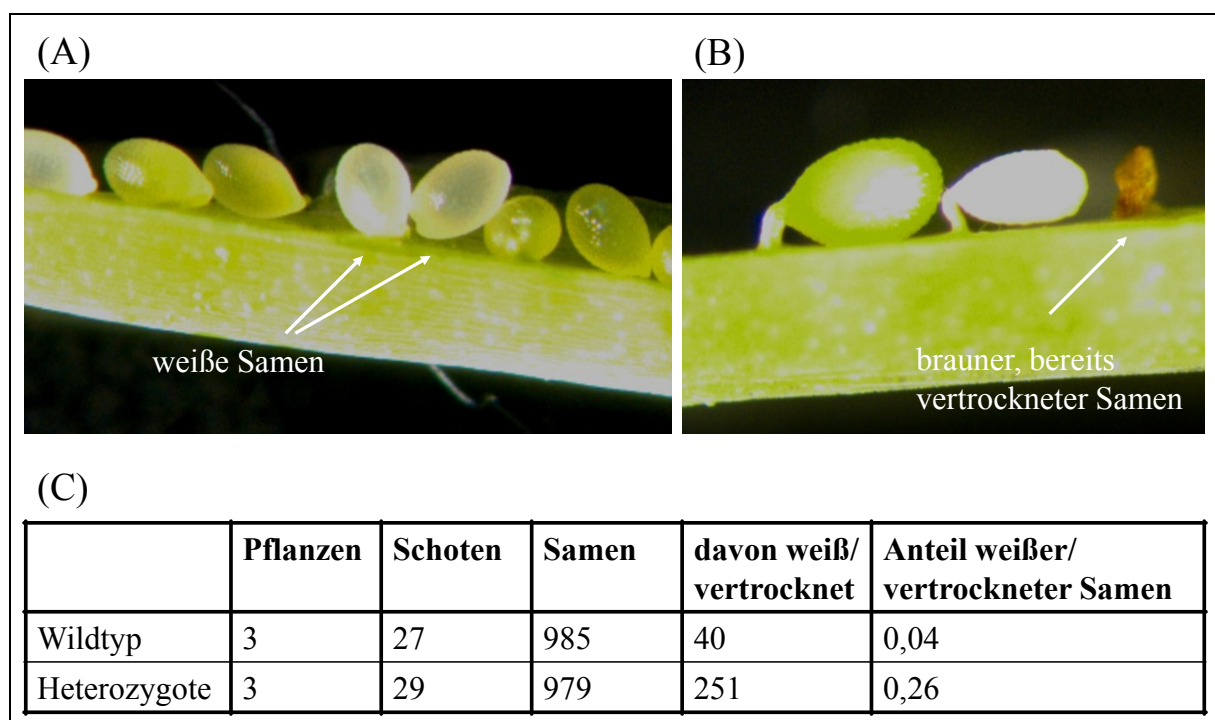


Abb. 24: Schoten von heterozygoten Pflanzen der Linie SALK_143438 mit einer T-DNA-Insertion in *Atppr51*

(A) Präparation der unreifen Schoten von Pflanzen der Linie SALK_143438, die gemäß Genotypisierung heterozygot für eine T-DNA-Insertion in *Atppr51* sind. Die weißen Samen zeigen einen Embryo-defekten Phänotyp der homozygoten *Atppr51*-Insertionsmutanten. (B) In reiferen Schoten sind neben weißen Samen zahlreiche braune, eingetrocknete und somit klar abgestorbene Samen nachzuweisen. (C) Zusammenfassung der Auszählung abortiver Samen in Schoten von Heterozygoten und Wildtypen. Es wurden jeweils drei genotypisierte Pflanzen und von jeder Pflanze mindestens sieben verschiedene Schoten analysiert. Während in Wildtyp-Pflanzen nur 4% der Samen absterben, weisen Heterozygote 26% weiße oder eingetrocknete Samen auf.

In den Samenschoten der Heterozygoten der Linie SALK_061241 waren jedoch nicht überproportional viele defekte Samen zu erkennen, obwohl auch keine homozygoten T-DNA-Mutanten in ihrer Nachkommenschaft identifiziert werden konnten. Eine mögliche Erklärung wäre ein Abbruch der Embryonalentwicklung zu einem sehr späten Zeitpunkt, der bei Betrachtung der Samen nicht erkennbar wäre. Deshalb wurde die Keimungsrate der Samen auf Pflanzenmedium im Vergleich zu Samen der Wildtyp-Geschwister ermittelt. Von den Wildtyp-Samen keimten etwa 78% bzw. 87%. Die Keimungsrate von Nachkommen der Heterozygoten der Linien SALK_143438 und SALK_061241 betrug mit 62% bzw. 66% annähernd 75% der Keimungsrate der Samen der Wildtyp-Geschwister (Tab. 2). Somit wurde geschlussfolgert, dass auch in der Linie SALK_061241 ein Viertel der Samen mit einem embryoletalen Phänotyp assoziiert ist. Da demnach zwei unabhängige Insertionen in *Atppr51*

zu einem Defekt in der Embryonalentwicklung führen, ist davon auszugehen, dass *Atppr51* essentiell für die Embryogenese ist.

Tab. 2: Keimungsrate von Samen heterozygoter *Atppr51*-T-DNA-Insertionsmutanten

Linie	Genotyp	Pflanzen	Samen	davon gekeimt	Keimungsrate
SALK_143438	Wildtyp	3	363	284	0,78
	Heterozygot	3	353	219	0,62
SALK_061241	Wildtyp	2	128	111	0,87
	Heterozygot	3	139	92	0,66

Zusammenfassung der Auszählung gekeimter Samen von Schoten heterozygoter Pflanzen und Wildtypen. Es wurden jeweils zwei bzw. drei genotypisierte Pflanzen und von jeder Pflanze mehrere Schoten für den Keimungstest verwendet. Die Samen wurden auf MS-Medium ausgebracht und unter Langtagbedingungen kultiviert. Die Keimungsrate der Samen Heterozygoter entspricht bei beiden Linien ca. 75% der Rate der Wildtyp-Samen.

3.2.3 Revers genetische Isolation von PPR-Mutanten aus *Zea mays*

Für eine Analyse von PPR50 und PPR51 in Mais sollten Mu-Transposon induzierte Mutanten isoliert werden. Dazu wurde die Sammlung von Mais-Mutanten der Universität Oregon, die PML, genutzt. Die DNA von etwa 2100 Mais-Keimlingen wurde in Proben mit je 20 Extrakten mittels PCR-Technik auf das Vorhandensein von Transposons im offenen Leserahmen oder in der 5'-UTR der Gene *ppr50* und *ppr51* untersucht (siehe Material und Methoden 2.2.15). Die Abbildung 25 zeigt die Suche nach *ppr51*-Mutanten. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 25A). Um eine höhere Spezifität zu erzielen, wurden die Produkte auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin-markierten *ppr51*-Sonde hybridisiert. Signale, die häufig auftraten, wurden als Hintergrund-Signal interpretiert (Abb. 25B, Spuren 3, 7, 8, 14). Proben, die von diesem Muster abweichende Signale aufwiesen (Abb. 25B, Spur 9) oder solche mit besonders intensiven Hybridisierungssignalen (Abb. 25B, Spur 5) wurden in einer zweiten PCR mit einem anderen *ppr51*-spezifischen PCR-Oligonukleotid analysiert. In vier von acht Proben wurde das Signal der ersten PCR durch ein erneutes Signal der korrespondierenden Größe bestätigt (Abb. 25C, Proben 5, 9, 30, 46). Von diesen wurden die 20 individuellen Extrakte durch PCR und ggf. Southern-Transfer und -Hybridisierung untersucht und so Mais-Keimlinge mit Mu-Transposon-Insertionen in *ppr51* identifiziert (Abb. 25D). Zwei dieser Insertionen konnten in Verwandten der Keimlinge durch Genotypisierung nachgewiesen

werden. Diese Insertionen waren somit vererbbar. Durch Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die Transposons im ersten Exon (*ppr51-1*, Position +35nt, Abb. 26G) bzw. im ersten Intron (*ppr51-2*, Position +421 nt, Abb. 26G) lokalisiert. Mutanten beider Linien zeigten einen elfenbeinfarbenen Phänotyp und starben nach ca. zwei Wochen (Abb. 26C bis E).

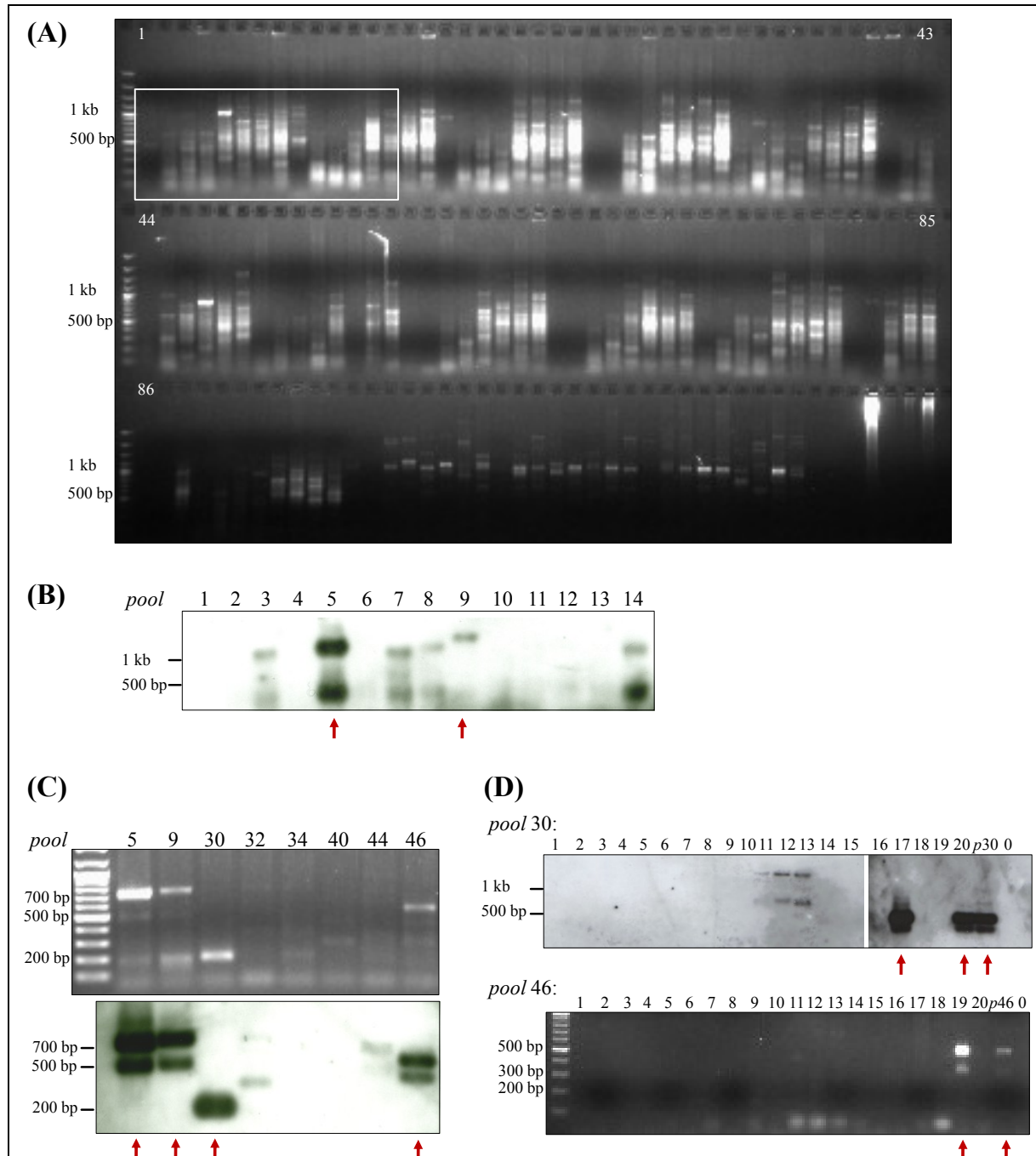


Abb. 25: PCR-basierte Identifikation von Mu-Transposon-induzierten Mais-Mutanten für *ppr51* in der *Photosynthetic Mutant Library* der Universität Oregon (PML)

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte aller 128 DNA-Sammelproben (*pools*) der PML, die in der initialen PCR mit den Oligonukleotiden eoMu und PPR51ScreenR2 (siehe Tab. 3) generiert wurden, in einem 1,5%igen Agarosegel. Die DNA wurde durch Southern-Transfer auf eine Nylonmembran übertragen. Der weiße Rahmen kennzeichnet den unter (B) gezeigten Teilbereich. (B) Für eine höhere Sensitivität wurden die Membran-gebundenen PCR-Produkte mit einer *ppr51*-Sonde hybridisiert. Dargestellt ist ein Ausschnitt des hybridisierten Filters. Die *pools* 1, 2, 4, 6, 10, 11, 12 und 13 zeigten keine Signale, obwohl unspezifische PCR-Produkte amplifiziert wurden (siehe Abb. 25A). Das mehrfach auftretende Hybridisierungssignal in den *pools* 3, 7, 8 und 14 wurde aufgrund seiner Häufigkeit als Hintergrundsignal betrachtet. Das Signal in *pool* 5 war sehr stark, sodass diese Probe nachfolgend näher analysiert wurde. Auch das in *pool* 9 detektierte Signal, das im Agarosegel noch nicht zu identifizieren war, gab aufgrund seiner Einzigartigkeit Anlass zu weiteren Untersuchungen. (C) Eine zweite PCR mit den Oligonukleotiden eoMu und PPR51ScreenR4 wurde mit allen Proben durchgeführt, für die in der initialen PCR bzw. bei der Hybridisierung der Membran-fixierten Amplifikate mit einer *ppr51*-Sonde interessante Signale detektiert wurden. In vier dieser Proben wurden im Agarosegel (oben) PCR-Produkte nachgewiesen, die ca. 300 bp kürzer als die mit PPR51ScreenR2 amplifizierten Produkte waren, was dem Abstand von PPR51ScreenR2 und PPR51ScreenR4 entspricht. Die Hybridisierung (unten) bestätigte die Spezifität der Produkte. (D) Die je 20 DNA-Extrakte, aus denen sich die Proben 5, 9, 30 und 46 zusammensetzten, wurden analysiert. Mit den Individuen Nr. 17 und 20 von *pool* 30 (oben) und Nr. 19 von *pool* 46 (unten) wurden die gleichen Amplifikate generiert wie in den *pools* (Kennzeichnungen *p30* und *p46*). Auch die Analyse der Proben 5 und 9 führte zur Identifikation zweier Mais-Pflanzen, doch in Verwandten dieser Keimlinge konnten die Insertionen später nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Analog wurden in Zusammenarbeit mit Sabrina Finster im Rahmen ihrer Diplomarbeit zwei *ppr50*-Insertionslinien identifiziert. Zusammen mit S. Finster erfolgte auch die sich anschließende Analyse der Mais-Mutanten. Es konnte eine Linie mit einem Mu-Element im *ppr50*-Intron isoliert werden (*ppr50-3*, +372 nt, Abb. 26F). Homozygote Mutanten der Linie waren albinotisch (Abb. 26A). In einer weiteren Linie, *ppr50-4*, wurde eine Transposon-Insertion in der 5'-UTR nachgewiesen (-24 nt, Abb. 26F). Der Phänotyp der Mutanten war albeszent (Abb. 26B). Dieser Begriff bezeichnet einen Phänotyp, bei dem die Blattspitzen der Keimlinge, also die ältesten Gewebe, grün und die jüngeren Gewebe zunehmend albinotisch sind. Der Phänotyp einzelner Keimlinge der Linie *ppr50-4* war unterschiedlich stark ausgeprägt. Vermutlich in Abhängigkeit von den Speicherreserven des Maiskorns waren einige Keimlinge im Grundton etwas grüner, andere heller (Abb. 26B). Auch die *ppr50*-Mais-Mutanten waren keimlingsletal.

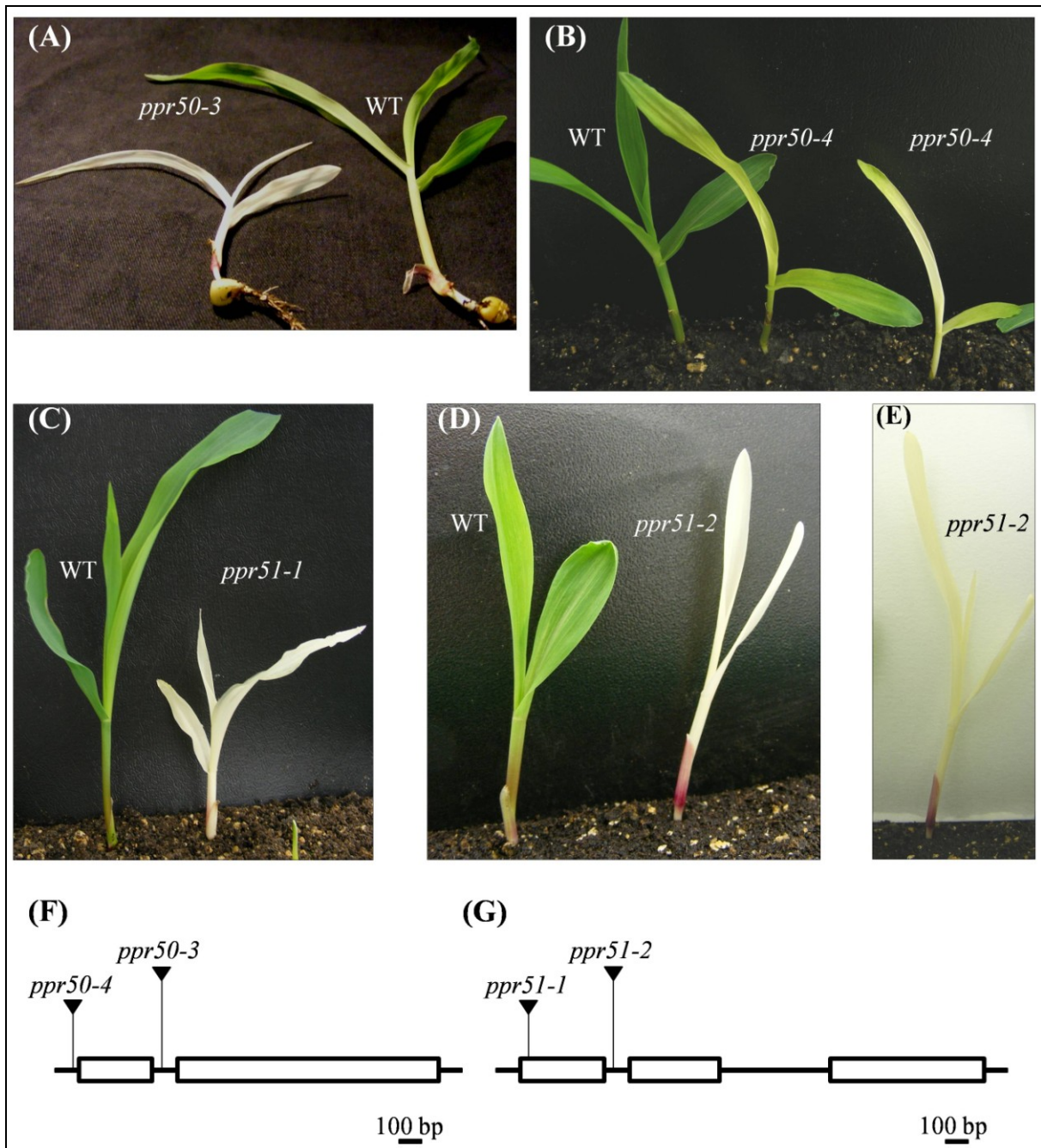


Abb. 26: Mu-Transposon induzierte *ppr50*- und *ppr51*-Mais-Mutanten

Die gezeigten Mais-Keimlinge sind ca. 14 Tage alt und wurden auf Erde unter Langtagbedingungen bei 27 °C angezogen. Die PPR-Mutanten sterben als Keimlinge. (A) Albinotischer Phänotyp der *ppr50-3*-Mutanten, die eine Mu-Element-Insertion im Intron aufweisen, im Vergleich zum Wildtyp (WT). (B) Albeszenter Phänotyp der *ppr50-4*-Mutanten mit einem Mu-Transposon in der 5'-UTR. Trotz gleichen Genotyps variiert der Phänotyp der Mutanten, der rechts gezeigte Keimling ist insgesamt weniger grün als der Keimling in der Mitte. (C) Albinotischer Phänotyp der *ppr51-1*-Mutanten, die ein Transposon im ersten Exon aufweisen. (D) Albinotischer Phänotyp der *ppr51-2*-Mutanten, für die eine Mu-Element-Insertion im ersten Intron nachgewiesen wurde. (E) Ein *ppr51-2*-Keimling vor weißem Hintergrund. Der Phänotyp der *ppr51-1*- und *ppr51-2*-Mutanten ist nicht papierweiß, sondern elfenbeinfarben. (F) und (G) Maßstabsgetreue Skizzen der Lokalisationen der Transposon-Insertionen in *ppr50*- und *ppr51*-Pflanzen. Exons sind als Rechtecke, Introns und UTR-Sequenz als Linien dargestellt.

3.2.4 Akkumulation von Photosynthesekomplexen in *ppr50*- und *ppr51*-Mutanten

Zur Charakterisierung der plastidären Genexpression der isolierten PPR-Mutanten wurde die Akkumulation der Photosynthesekomplexe RuBisCo, ATP-Synthase, Cytochrom b_6f -Komplex, Photosystem I und Photosystem II, welche jeweils plastidär kodierte Untereinheiten enthalten, analysiert. Die Akkumulation der großen Untereinheit der RuBisCo wurde dabei über Ponceau-Färbung von gelelektrophoretisch aufgetrennten und auf eine Membran transferierten Gesamt-Proteinextrakten visualisiert. Repräsentative Untereinheiten der anderen Komplexe wurden durch immunologischen Nachweis detektiert.

Für die Analyse der *ppr50*-Mutanten wurden zwei Mais-Mutanten der Linie *ppr50-4* mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Chlorophyll-Defizit (siehe 3.2.3) untersucht. Die Expression der photosynthetischen Enzymkomplexe beider Mutanten war, ähnlich wie in der *ppr5-1* x *ppr5-2*-Kreuzungsmutante, auf 10% (AtpB, *ppr50-4* 2) bzw. weniger als 10% der im Wildtyp nachzuweisenden Enzymmengen reduziert (Abb. 27A). Die hellere Mutante (*ppr50-4* 1) zeigte dabei für alle betrachteten Proteine etwas geringere Proteinlevel als die Mutante mit grünerem Phänotyp (*ppr50-4* 2), obwohl sich die beiden Mutanten genotypisch nicht unterschieden.

Mutanten der Linien *ppr51-1* und *ppr51-2* wurden im Vergleich mit einer *ppr5-1*-Mutante charakterisiert. Wie die Abbildung 27B zeigt, akkumulierten die analysierten Proteine in den Mutanten in kaum zu detektierenden Mengen. Erst bei sehr starker Exposition konnten Spuren der Enzyme nachgewiesen werden (siehe Abb. 27B, AtpB-Expression, untere Zeile). Ähnliches wurde zuvor für andere albinotische Mais-Keimlinge beobachtet, so auch für *ppr2*-Mutanten (Williams und Barkan, 2003). Im Kontext dieser Ergebnisse war davon auszugehen, dass in den albinotischen *ppr50-3*-Mutanten die Proteinkomplexe der Photosynthese in noch geringeren Mengen als in den albeszenten *ppr50-4*-Pflanzen nachzuweisen sein sollten.

Die immunologische Analyse der Mutanten offenbarte keinen spezifischen Defekt nur eines Enzymkomplexes. Die albinotische Pigmentierung der *ppr50-3*- und *ppr51*-Insertionsmutanten sowie die starke Reduktion aller photosynthetischen Enzymkomplexe, welche plastidär kodierte Untereinheiten enthalten, in den analysierten Keimlingen lassen einen globalen Verlust plastidär kodierter Proteine in *ppr50*- und *ppr51*-Mutanten vermuten. Denn vergleichbare Defekte der Proteinakkumulation und des Phänotyps liegen in *ppr5*-Mutanten vor (Abb. 27 und 3.1.2, Abb. 13A). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, interagiert PPR5 mit der plastidären tRNA-Glycin (UCC) und ist für deren Akkumulation essentiell (siehe 3.1). Die Reduktion der Photosyntheseproteine sollte demnach sekundär aus

einem primären Defekt in der Biogenese dieser für die plastidäre Translation relevanten RNA resultieren. Eine sekundär bedingte Reduktion der photosynthetischen Enzymkomplexe in *ppr50*-Mutanten könnte durchaus die unterschiedliche Schwere des Defekts in verschiedenen *ppr50-4*-Pflanzen erklären. Reservestoffe des Samenkorns könnten das Defizit an plastidären Translationsprodukten in den grüneren Mutanten etwas kompensieren, während die Akkumulation der plastidären Proteine in den phänotypisch helleren Mutanten fast ausschließlich von den vom Keimling selbst produzierten Proteinen abhängt. Die Annahme, PPR50 und PPR51 könnten primär spezifische für die Translation benötigte chloroplastidäre Transkripte beeinflussen und nicht Transkripte für alle fünf untersuchten Proteinkomplexe, würde zudem im Einklang mit der gemäß derzeitigem Kenntnisstand postulierten Funktion der PPR-Proteine als hochspezifische RNA-Bindeproteine stehen. So konzentrierten sich weitere Analysen der isolierten Mutanten auf den Metabolismus der Transkripte ausgewählter plastidärer Gene.

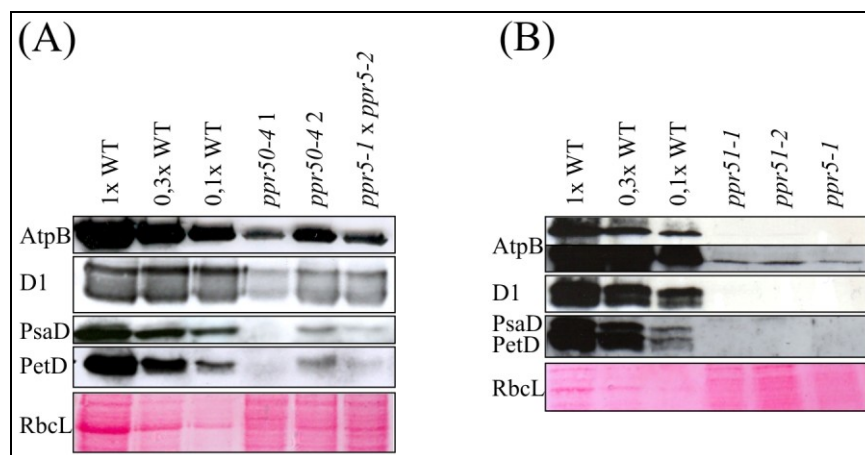


Abb. 27: Verlust bzw. Reduktion plastidär kodierter Proteine in *ppr50*- und *ppr51*-Mutanten

Analyse der Akkumulation repräsentativer Untereinheiten der photosynthetischen Enzymkomplexe ATP-Synthase (AtpB), Cytochrom b_6f -Komplex (PetD) sowie Photosystem I (PsaD) und II (D1) in *ppr50*- und *ppr51*-Mutanten. Blatt-Gesamt-Protein (Verdünnungen der Wildtyp-Probe wie indiziert) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und durch Immunodetektion analysiert. Die Färbung der Filter mit Ponceau-Lösung demonstriert die gleiche Ladung von Gesamt-Protein. (A) In *ppr50-4*-Mutanten sind alle Komplexe zu einem Zehntel oder weniger der im Wildtyp zu detektierenden Mengen reduziert. Auch die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL) ist gemäß der Anfärbung mit Ponceau-Lösung stark reduziert in *ppr50-4*-Pflanzen. (B) In *ppr51*-Mutanten sind die analysierten Enzyme kaum nachzuweisen, die Akkumulation beträgt schätzungsweise weniger als 1% der Wildtypmengen. Für AtpB ist gezeigt, dass bei sehr starker Exposition schwache Signale detektiert werden können (untere Zeile). Die Menge an RbcL ist in den albinotischen Mutanten ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze.

3.2.5 Spezifische Defekte in der Transkriptakkumulation in *ppr2*-Mutanten

Die Wahl von PPR2, PPR50 und PPR51 für eine erste Charakterisierung motivierte die Frage, ob es Gemeinsamkeiten in den Funktionen nahe verwandter PPR-Proteine geben könnte. Tatsächlich implizierten der Phänotyp der isolierten Mutanten sowie die Analyse der Photosynthesekomplexe, dass PPR50 und PPR51 ebenso wie PPR5 für die plastidäre Translation in Mais notwendig sind. Gleiches konnte von der Arbeitsgruppe von Prof. Barkan (Universität Oregon, USA) für PPR2 gezeigt werden (Williams und Barkan, 2003). Für eine weitergehende Charakterisierung der PPR-Proteine wurden Mutanten mittels Northern-Hybridisierungen analysiert. Die RIP-Chip-Technik, welche für die Identifikation des RNA-Interaktionspartners von PPR5 genutzt wurde, konnte bei der Funktionsanalyse von PPR2, PPR50 und PPR51 nicht zur Anwendung kommen. Es erfolgten mehrere Versuche, Antikörper gegen diese Proteine zu generieren, doch die gewonnenen Antikörper zeigten nicht die erforderliche Spezifität.

Um die Ursache des Translationsdefekts in albinotischen *ppr2*-Nullmutanten zu bestimmen, wurde bereits von Williams und Barkan die Akkumulation zahlreicher plastidär kodierter Transkripte, insbesondere solcher, die eine Rolle in der Translation spielen, analysiert. Spezifische Defekte wurden dabei von den Autoren jedoch nicht festgestellt (Williams und Barkan, 2003). Aufgrund der Interaktion von PPR5 mit einer tRNA, die ein Intron enthält, waren maßgeblich zu spleißende Transkripte im Rahmen der hier vorgestellten PPR2-Analyse von Interesse. Die Akkumulation der Intron-haltigen tRNA-Valin (UAC) fehlte in der Studie von Williams und Barkan, sodass diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Obgleich in albinotischen Keimlingen primäre sehr schwer von sekundären Defekten zu unterscheiden sind, da die Akkumulation der Transkripte generell stark reduziert ist, zeigte sich interessanterweise im Vergleich zu zwei anderen Albino-Mutanten (*ppr5-1* und *iojap*) eine sehr niedrige Abundanz der reifen tRNA-Valin (Abb. 28, oben). Weitere plastidäre Transkripte wurden zur Kontrolle analysiert, die keine spezifisch in *ppr2*-Keimlingen auftretenden Defekte offenbarten. Bei einer Hybridisierung mit einer Sonde komplementär zu der tRNA-Isoleucin (GAU), welche ebenfalls gespleißt werden muss, war allerdings in keiner albinotischen Pflanze die reife tRNA zu detektieren (Abb. 28, unten links). Um einen möglichen Einfluss von photooxidativem Stress in den Albino-Keimlingen zu minimieren, wurden in einem Folgeexperiment Pflanzen untersucht, die in Dunkelheit angezogen wurden, nachdem sie unter Langtagbedingungen gekeimt waren. Die so kultivierten Mutanten zeigten tatsächlich stärkere Hybridisierungssignale. So erlaubten die zum Vergleich herangezogenen Mutanten *ppr5-1* und *iojap* den Nachweis der gespleißten tRNA-Isoleucin, in *ppr2*-Mutanten

war dies jedoch nicht möglich (Abb. 28, unten rechts). Weitere Northern-Analysen mit im Dunkeln gewachsenen *ppr2*-Keimlingen zeigten auch unter diesen Bedingungen den Defekt in der Akkumulation der reifen tRNA-Valin (Abb. 28, oben rechts). Weiterhin wurde die Akkumulation der *trnG-UCC*- und der *atpF*-Transkripte untersucht, welche sich nicht von der in den anderen albinotischen Mutanten unterschied (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse der *trnA-UGC*-Transkriptakkumulation ergab eine mögliche Reduktion des ungespleißten Vorläufers in *ppr2*-Mutanten, bzgl. der reifen tRNA war jedoch auch bei im Dunkeln gewachsenen Pflanzen keine Aussage zu treffen (Abb. 30 und weitere Daten, nicht gezeigt).

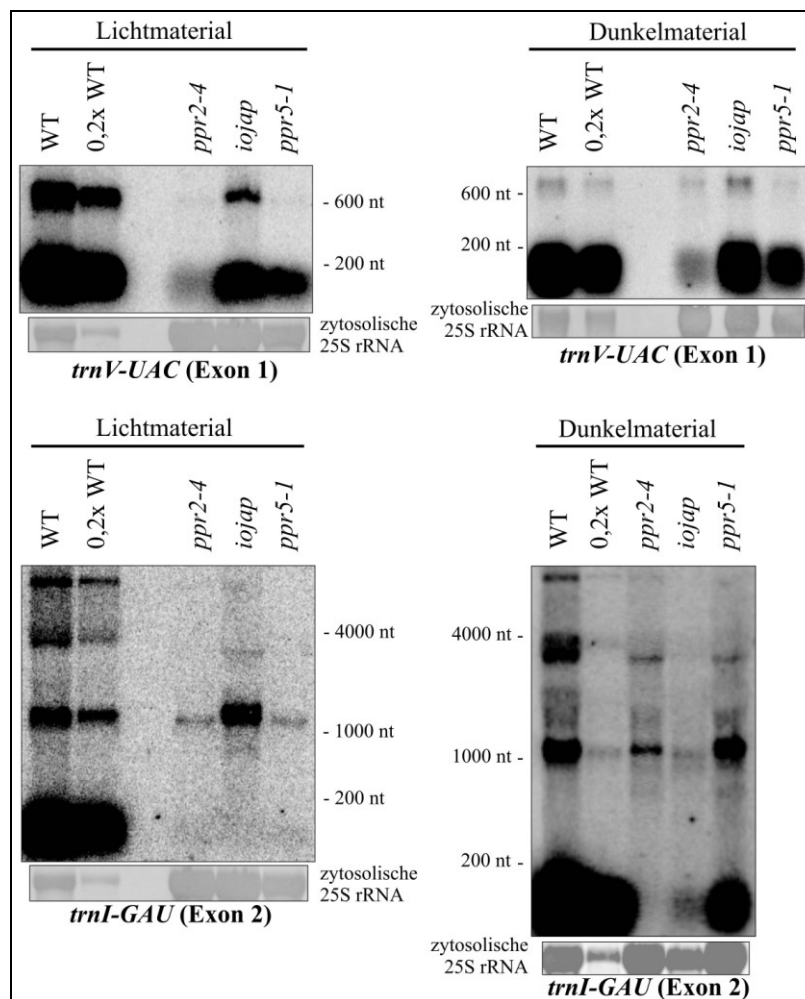


Abb. 28: Northern-Analysen der Akkumulation der tRNA-Valin und -Isoleucin in *ppr2*-Mutanten

Es wurden 10 µg Blatt-Gesamt-RNA der Albinos bzw. 5 µg RNA von Wildtypen (WT) in 1,2% Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-Membranen transferiert und mit Oligonukleotid-Sonden für *trnV-UAC* respektive *trnI-GAU* hybridisiert. Anhand der zytosolischen 25S rRNA (Methylenblau-Färbung) kann die Beladung beurteilt werden. Die Beschriftung „Lichtmaterial“ kennzeichnet Proben, die aus unter Langtagbedingungen kultivierten Keimlingen extrahiert wurden. RNA-Extrakte aus Pflanzen, die nach der Keimung ohne Licht gewachsen sind, sind mit „Dunkelmaterial“ bezeichnet. In *ppr2*-Mutanten akkumuliert die tRNA-Valin im Vergleich zu anderen Mutanten reduziert. Die reife tRNA-Isoleucin liegt in im Dunkeln angezogenen *ppr2*-Pflanzen reduziert vor. Unter Lichtstress ist diese tRNA in albinotischen Keimlingen kaum nachweisbar.

Eine direkte Interaktion von PPR2 mit der tRNA-Valin und der tRNA-Isoleucin nachzuweisen war aufgrund fehlender spezifischer Antikörper nicht möglich. Zudem können weitere als die gezeigten Defekte in *ppr2*-Mutanten nicht ausgeschlossen werden. Der molekulare Phänotyp der Mutanten belegt jedoch, dass PPR2 für die Akkumulation oder das Spleißen der genannten tRNAs benötigt wird. Ob dies die primäre Funktion des Proteins ist, ist nicht zweifelsfrei abzuleiten.

3.2.6 Akkumulation von plastidären tRNAs in *ppr50*-Mutanten

Da PPR5 mit der tRNA-Glycin interagiert und für die Stabilität des ungespleißten Vorläufers benötigt wird und in *ppr2*-Mutanten Defekte in der Akkumulation der tRNA-Valin und der tRNA-Isoleucin gezeigt werden konnten, stellte sich die Frage, ob auch die anderen beiden PPR-Proteine dieser Verwandtschaftsgruppe für die Stabilität oder Prozessierung von ungespleißten tRNA-Vorläufern verantwortlich sein könnten.

Somit wurde die Akkumulation aller plastidär kodierten tRNAs, die gespleißt werden müssen, analysiert. Aufgrund des etwas unterschiedlichen Phänotyps verschiedener Keimlinge der *ppr50-4*-Linie wurden für die Northern-Analysen stets entweder die RNA-Extrakte mehrerer Individuen zu einer Probe vereinigt oder parallel die RNA-Isolate von zwei Individuen mit unterschiedlich stark ausgeprägten phänotypischen Defekten verwendet. Als Kontrolle wurden *ppr5*-Mutanten genutzt, die ein vergleichbares Chlorophyll-Defizit aufwiesen. Wie die Abbildung 29 belegt, zeigten die Mutanten keine spezifischen Defekte, die reifen tRNAs und die noch nicht gespleißten Vorläufer waren in *ppr50-4*-Mutanten in ähnlicher Abundanz wie in Wildtypen und *ppr5-1* x *ppr5-2*-Mutanten vorhanden. Eine Ausnahme bildete selbstverständlich die Akkumulation der tRNA-Glycin, die in *ppr5*-Mutanten gestört ist. Auch die albinotischen *ppr50-3*-Mutanten zeigten ähnliche Defekte wie die *ppr5-1*-Mutanten, welche somit als sekundär zu interpretieren sind. Es ließ sich jedoch bei einigen reifen Transkripten (tRNA-Isoleucin und tRNA-Leucin, Abb. 28), eine etwas unterschiedliche Schwere der Defekte erkennen, die *ppr5-1*-Pflanzen waren von pleiotropen Effekten etwas stärker betroffen. Das verdeutlicht die Komplexität sekundärer Defekte in Albinos, weshalb die Transkriptabundanz in albinotischen Pflanzen Rückschlüsse auf ursächliche Defekte nur unter Vorbehalt zulässt.

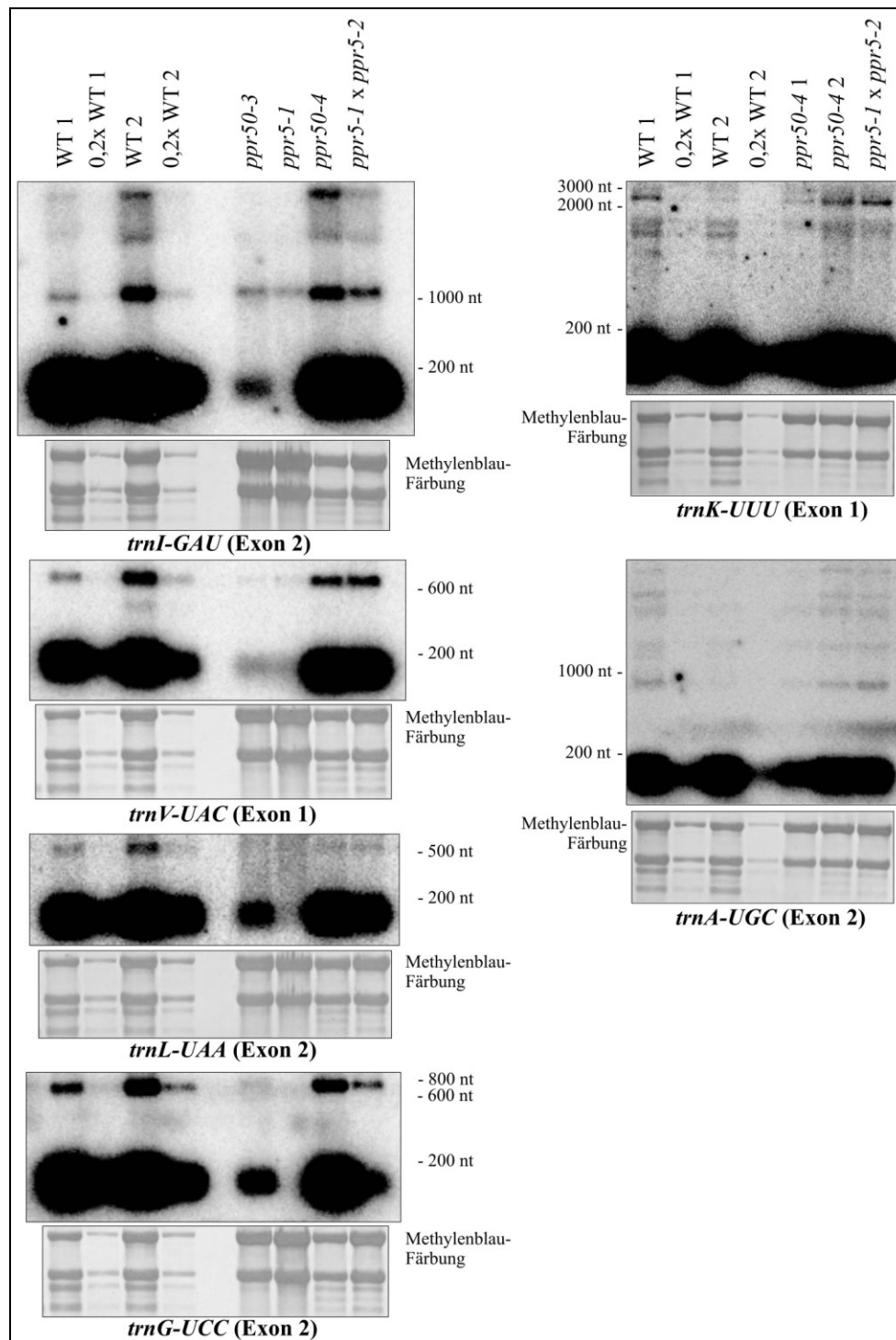


Abb. 29: Northern-Analysen der Akkumulation ausgewählter plastidärer tRNAs in *ppr50*-Mutanten

Es wurden 5 µg Blatt-Gesamt-RNA (bzw. 10 µg RNA der albinotischen Keimlinge) von Wildtypen (WT, Verdünnungen wie angegeben), *ppr50*-Mutanten und, zum Vergleich, *ppr5*-Mutanten in 1,2% Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-Membranen transferiert und mit Oligonukleotid-Sonden für alle plastidär kodierten zu spleißenden tRNAs hybridisiert. Für die Hybridisierungen mit *trnI*, *trnV*, *trnL* und *trnG* wurden von *ppr50-4*, *ppr50-3* und *ppr5-1* jeweils Extrakte von mehreren genotypisierten Keimlingen vereinigt. Die Methyleneblau-Färbungen der Membranen verdeutlichen eine gleichmäßige Beladung. Es sind keine spezifischen Defekte in der Akkumulation der analysierten tRNAs in *ppr50*-Mutanten zu detektieren.

3.2.7 Akkumulation von plastidären tRNAs in *ppr51*-Mutanten

Auch in den *ppr51*-Mutanten sollte die Akkumulation der sechs plastidären tRNAs, deren Gene Introns enthalten, mittels Northern-Analysen untersucht werden. Dafür wurden je zwei Keimlinge der Linie *ppr51-1* verwendet. Die Linie *ppr51-2* konnte aus Materialgründen nicht für alle Experimente genutzt werden. Es wurden jeweils mehrere andere albinotische Insertionsmutanten zum Vergleich eingesetzt.

Es waren für alle analysierten tRNAs keine spezifischen Defekte in *ppr51*-Mutanten nachzuweisen. Sowohl die ungespleißten Vorläufer als auch die reifen tRNA-Moleküle akkumulierten in *ppr51-1*-Mutanten. Im Vergleich zum Wildtyp betrugen die Signalintensitäten dabei etwa 50% (Abb. 30, die unterschiedliche Beladung bei Wildtypen und *ppr51-1*-Keimlingen ist zu berücksichtigen). Anders als bei den parallel analysierten anderen albinotischen PPR-Mutanten (Abb. 30, siehe auch Abb. 28 und 29) fiel auf, dass die *ppr51-1*-Mutanten nur sehr schwache pleiotrope Defekte aufwiesen, insbesondere die Abundanz der gespleißten Transkripte war hoch. Da in *ppr51-2*-Mutanten jedoch die beispielhaft betrachteten reifen Transkripte der Gene *trnK-UUU*, *trnL-UAA* und *trnA-UGC* kaum zu detektieren waren und diese Albinos sich somit nicht deutlich von anderen PPR-Mutanten ähnlichen Phänotyps unterschieden (Abb. 30), kann dies nicht als Hinweis auf den primären Defekt verstanden werden. Die pleiotropen Defekte in beiden *ppr51*-Mutantenlinien waren verschieden stark ausgeprägt wie es ebenfalls für die Insertionen *ppr5-1* und *ppr5-2* bzw. *ppr50-3* und *ppr50-4* zu beobachten war. Doch es handelt sich bei *ppr5-2* und *ppr50-4* um hypomorphe 5'-UTR-Insertionen mit hellgrünem Phänotyp. Die Transposon-Insertion in *ppr51-1* ist mit einem Albino-Phänotyp verknüpft und sollte aufgrund ihrer Lokalisation im ersten Exon zu einem Nullallel führen. Mit einem PPR51-Antikörper wäre es möglich, zu analysieren, ob beispielsweise ein im 5'-Bereich verkürztes PPR51-Protein in *ppr51-1*-Mutanten gebildet wird. Gemäß eigenen Beobachtungen können Sequenzbereiche von Mu-Elementen als Promotor fungieren. So entstandene Transkripte müssten dabei jedoch korrekt zu translatieren sein und in die Chloroplasten importiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das tatsächliche vom erstellten Genmodell abweicht. So gibt es an der Position +34 bis +36 ein zweites ATG-Kodon im Leserahmen. Die vorhergesagte Lokalisation für ein solches Protein wäre jedoch nicht in den Plastiden, sondern in den Mitochondrien.

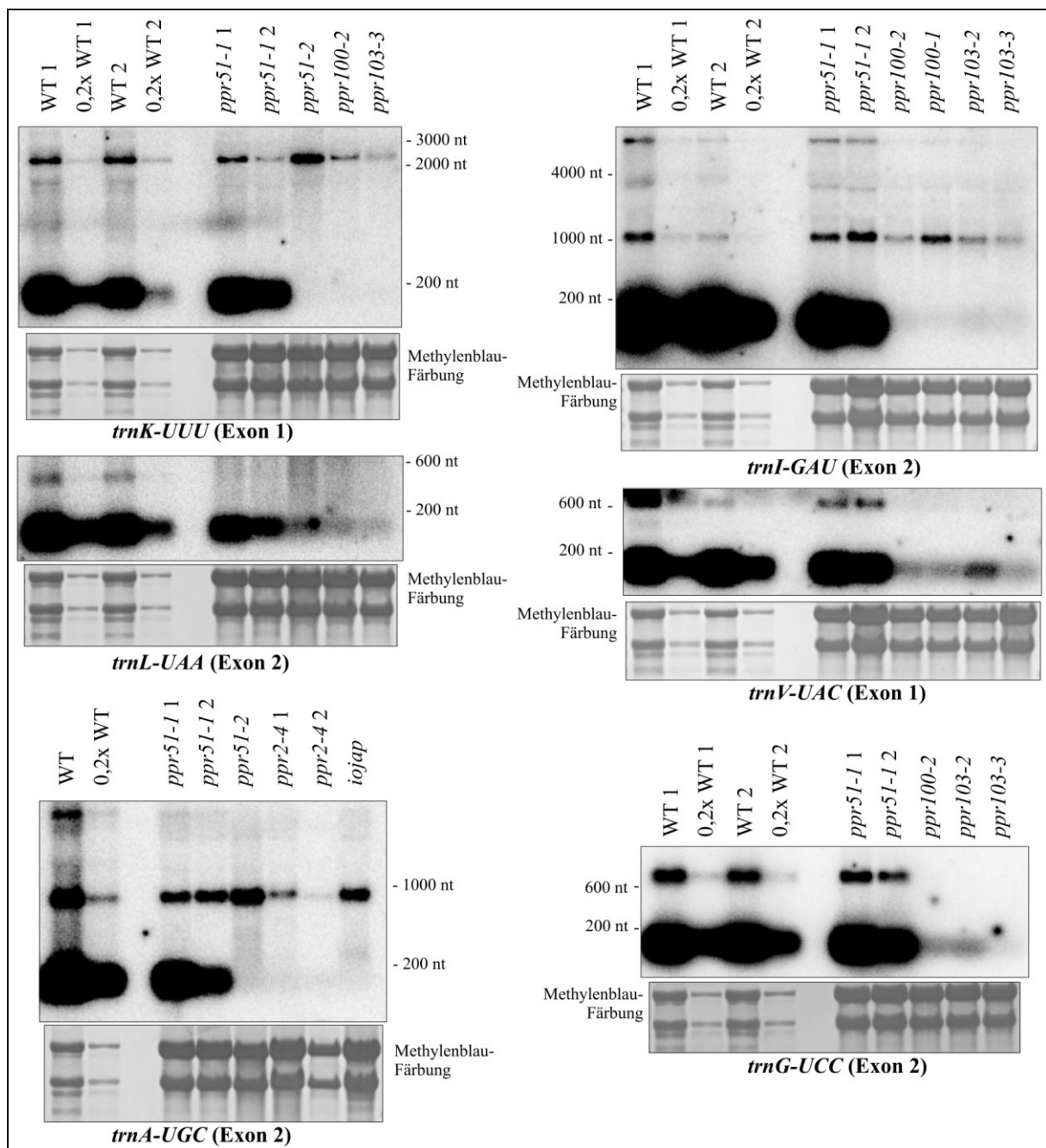


Abb. 30: Northern-Analysen der Akkumulation ausgewählter plastidärer tRNAs in *ppr51*-Mutanten

Es wurden 5 µg Blatt-Gesamt-RNA von Wildtypen (WT, Verdünnungen wie angegeben) bzw. 10 µg RNA von albinotischen Mutanten in 1,2% Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-Membranen transferiert und mit Oligonukleotid-Sonden für alle plastidär kodierten zu spleißenden tRNAs hybridisiert. Die Methyleneblau-Färbungen der Membranen zeigen die RNA-Beladung. Es sind keine spezifischen Defekte in der Akkumulation der analysierten tRNAs in *ppr51*-Mutanten zu detektieren. Pleiotrope Defekte sind in den beiden *ppr51*-Linien unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die Analysen der *ppr50*- und *ppr51*-Mutanten führten nicht zur Identifikation spezifischer Defekte im Metabolismus der analysierten tRNAs. Die Hypothese, die drei nächsten Ver-

wandten von PPR5 in Mais werden alle ebenfalls für die Akkumulation einer plastidären tRNA, deren Primärtranskript ein Intron enthält, benötigt, kann somit nicht aufrecht erhalten werden. Aufgrund des Phänotyps der Mutanten, der Reduktion aller Photosynthesekomplexe, die plastidär kodierte Untereinheiten enthalten sowie der stark reduzierten Akkumulation der ribosomalen RNA, insbesondere in den albinotischen Pflanzen (Abb. 29 und 30, Methylenblau-Anfärbungen) ist jedoch anzunehmen, dass alle vier PPR-Proteine in Mais für die plastidäre Translation essentiell sind. Für *ppr2*-Mutanten konnte ein Defekt in der Akkumulation von zwei plastidären tRNAs gezeigt werden, der ursächlich für den Translationsdefekt sein könnte.

3.3 Die Funktion von orthologen PPR-Proteinen: Analyse von PPR54 in *Zea mays*

Eine Genom-weite Analyse der PPR-Gene in *A. thaliana*, *O. sativa* und *P. patens* impliziert, aufgrund der Expansion der Familie vor der evolutionären Trennung von Mono- und Eudikotylen und der wenigen unabhängigen Duplikationen oder Genverluste seitdem, eine Konservierung der Funktion orthologer PPR-Proteine in monokotylen und eudikotylen Pflanzen (O'Toole *et al.*, 2008). Gezeigt wurde dies bisher jedoch nicht. Da die Analyse orthologer Proteine in Mono- und Eudikotylen somit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der PPR-Proteine leisten könnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit das PPR-Protein PPR54 in *Zea mays* untersucht werden, dessen Funktion in *Arabidopsis thaliana* durch Michael Tillich bereits charakterisiert wurde (nicht veröffentlichte Daten).

3.3.1 Identifikation einer *ppr54*-Mais-Mutante

In *Arabidopsis* kodiert der Locus At1g02150 das mit PPR54 (AtPPR54) bezeichnete PPR-Protein. Wie es zuvor für *ppr50* beschrieben wurde (3.2.1), wurde auch das *ppr54*-Gen in Mais durch eine Datenbankrecherche mit dem Reis-Ortholog *Osppr54* (entspricht Os04g0544400, <http://pogs.uoregon.edu>) unter Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) identifiziert. Die Nukleotidsequenz dieses Mais-Gens war zu 84% identisch mit der kodierenden Sequenz von *Osppr54*. PPR54 ist, gemäß den Lokalisationsvorhersagen von TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) und Predotar (Small *et al.*, 2004), ein chloro-

plastidäres Protein und weist zehn PPR-Motive des P-Typs auf (TPRpred, Karpenahalli *et al.*, 2007, siehe Abb. 31).

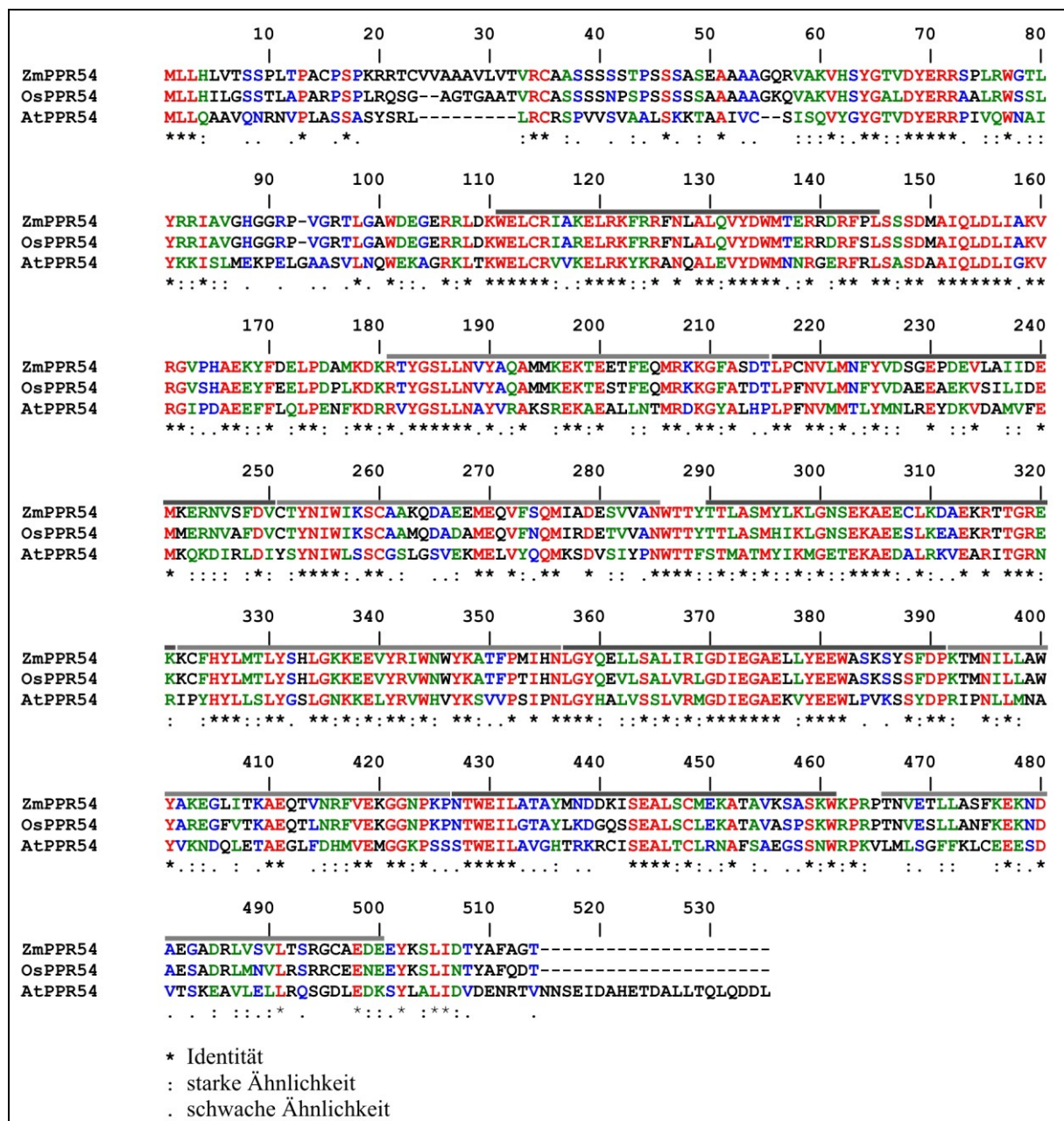


Abb. 31: Alignment der PPR54-Aminosäuresequenzen aus Mais, Reis und *Arabidopsis*

Erstellung eines alignments mit dem ClustalW-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994). Die grauen Balken kennzeichnen die PPR-Motive gemäß TPRpred (Karpenahalli *et al.*, 2007). Der Grad der Übereinstimmung ist unter der Sequenz durch Symbole (siehe Legende) bzw. durch Farbkodierung im alignment angegeben (siehe auch Abb. 19).

Zur Analyse von PPR54 wurde eine Mais-Mutante unter Nutzung der PML der Universität Oregon (USA) gesucht. Mittels PCR mit *ppr54*-spezifischen und Mu-Transposon-spezifischen

fischen Oligonukleotiden konnte eine Pflanze mit einer Transposon-Insertion in der 5'-UTR von *ppr54* identifiziert (Abb. 32A) und die Insertion durch Sequenzierung vor der Position -22 bestätigt werden. In Nachkommen und Geschwistern konnte diese Insertion ebenfalls gezeigt werden, somit wurde eine *ppr54*-Insertionslinie isoliert. Interessanterweise ist der Phänotyp der Mutanten leicht hellgrün (Abb. 32B), während sich *Arabidopsis-ppr54*-T-DNA-Insertionsmutanten nicht vom Wildtyp unterscheiden (M. Tillich, nicht veröffentlicht). Die homozygoten Mutanten überleben das Keimlingsstadium und sind fertil. In fünf anderen Individuen der PML wurden weitere Mu-Element-Insertionen durch PCR und Sequenzierung nachgewiesen, deren Vererbbarkeit zukünftig geprüft werden kann.

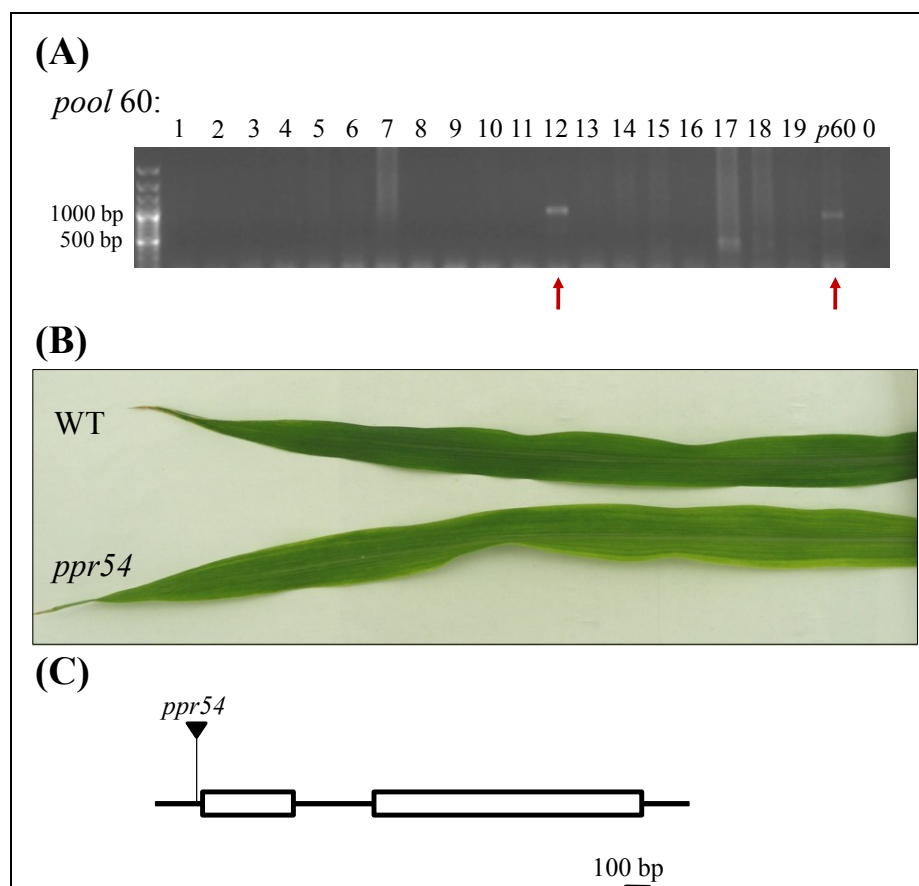


Abb. 32: Identifikation einer Mu-Transposon induzierten *ppr54*-Mais-Mutantenlinie

(A) In Individuum 12 der DNA-Extrakte von 19 Mais-Keimlingen enthaltenden Probe 60 (*pool* 60) der PML wurde in einer revers genetischen Analyse mittels PCR ein Mu-Transposon in der 5'-UTR von *ppr54* identifiziert. (B) Erstes Folgeblatt einer ca. vier Wochen alten Pflanze der *ppr54*-Mutantenlinie im Vergleich zu einem Wildtyp (WT) gleichen Alters. Der Phänotyp der Mutanten ist leicht hellgrün bei ansonsten normaler Entwicklung bei Anzucht auf Erde und unter Langtagbedingungen bei 27 °C. (C) Maßstabsgetreue Skizze der Lokalisation der Transposon-Insertion. Exons sind als Rechtecke, nicht kodierende Sequenzen als Linien dargestellt.

3.3.2 Analyse des Edierungsstatus von *ndhA-3*

Ursprünglich wurde ein Ortholog von PPR54 aus einem *Nicotiana tabacum*-Extrakt (NtPPR54) als Interaktionspartner eines 40 nt langen Fragments des plastidär kodierten *ndhA*-Gens von *Spinacia oleracea* isoliert, das eine Edierungsstelle im zweiten Exon, 13 nt stromabwärts von der Exon-Intron-Grenze positioniert, überspannt. Deshalb wurde angenommen, dass PPR54 ein Edierungsfaktor für diese Stelle sein könnte (M. Tillich, nicht publiziert). In Tabak ist ein Uracil an dieser Position bereits kodiert, nichtsdestotrotz könnte Tabak mit NtPPR54 einen Faktor für die Edierungsfunktion kodieren, denn Transkripte eines durch biolistische Chloroplasten-Transformation in Tabak eingebrachten *ndhA*-Fragments aus Spinat werden posttranskriptionell ediert, ein Faktor existiert demnach (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001). In *Arabidopsis-ppr54*-Mutanten wurden von Michael Tillich Defekte in der Prozessierung von *ndhA*-Transkripten nachgewiesen (nicht veröffentlichte Daten), die genannte Edierungsstelle gibt es jedoch ebenso wie in Tabak nicht. Somit kann in *Arabidopsis* diese mögliche Funktion von PPR54 nicht untersucht werden. In Mais dagegen enthält das *ndhA*-Transkript an der gleichen Position wie in Spinat ein zu edierendes Cytosin. Mit der Isolation einer *ppr54*-Mais-Mutante war es somit möglich, den Einfluss von PPR54 auf den Edierungsstatus von der in Mais mit *ndhA-3* bezeichneten Edierungsstelle zu analysieren.

Dazu wurde cDNA aus *ppr54*-Pflanzen und Wildtypen generiert. Mittels PCR wurden die Edierungsstelle *ndhA-3* enthaltende Fragmente amplifiziert (Abb. 33A). Von del Campo *et al.* (2000) wurde in Gerste gezeigt, dass die entsprechende Edierungsstelle, welche in Mais und Gerste an der 13. Position des zweiten Exons und demzufolge innerhalb der 3'-Intron-Exon-Spleißstelle lokalisiert ist, stets nur in gespleißten Transkripten ediert wird und in ungespleißten unediert vorliegt. So wurden die Amplifikate gespleißter Transkripte isoliert und mittels der unter 2.2.14 beschriebenen Methode sequenziert. In *ppr54*-Mutanten ebenso wie in Wildtypen lagen die Produkte vollständig ediert vor (Abb. 33B, Wildtyp-Proben und mit „a“ gekennzeichnete *ppr54*-Proben). Zum Vergleich sequenzierte Fragmente ungespleißter Transkripte waren nicht ediert (Abb. 33B). In einem alternativen Ansatz wurden durch die Verwendung eines PCR-Oligonukleotids, welches die Exon-Exon-Grenze überspannt, selektiv cDNA-Fragmente gespleißter Transkripte aus *ppr54*-Proben amplifiziert. Sie waren ebenfalls ediert (Abb. 33B, mit „b“ bezeichnet). Somit wurde in *ppr54*-Mais-Mutanten kein Defekt in der *ndhA-3*-Edierung nachgewiesen.

Die Betrachtung der amplifizierten cDNA-Fragmente offenbarte jedoch einen deutlichen Unterschied zwischen *ppr54*-Mutanten und Wildtypen. Das Verhältnis von RT-PCR-Produkten gespleißter zu denen ungespleißter Transkripte war entgegengesetzt. Während in

Wildtyp-Pflanzen vorwiegend Produkte, die kein Intron enthielten, amplifiziert wurden, waren es in den Mutanten ungespleißte (Abb. 33A). Das deutete auf einen *ndhA*-Spleißdefekt hin. Somit sollte mittels Northern-Analysen das *ndhA*-Transkriptmuster in Wildtypen und *ppr54*-Keimlingen verglichen werden.

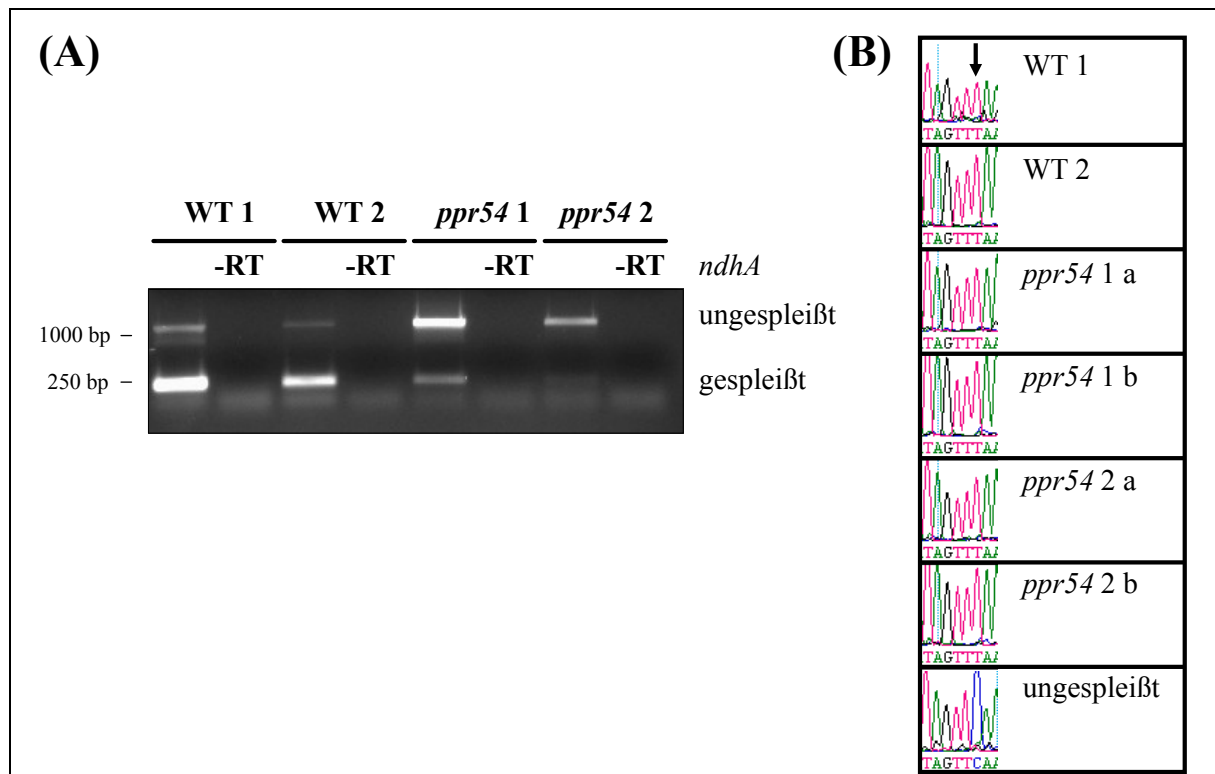


Abb. 33: Edierungsstatus von *ndhA*-3 in *ppr54*-Mais-Mutanten

Die Edierungsstelle *ndhA*-3 überspannende Transkripte aus Wildtypen und *ppr54*-Mutanten wurden durch RT-PCR amplifiziert und sequenziert. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die erwartete Länge von Amplifikaten ungespleißter Transkripte ist 1265 bp, die von Produkten gespleißter RNA ist 242 bp. Die einzelnen PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel isoliert und sequenziert. (B) Chromatogramme der Sequenzierungen der RT-PCR-Produkte. Die Edierungsstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die abgebildeten Sequenzen mit Ausnahme der untersten sind Sequenzierungen von PCR-Produkten, die kein Intron enthielten (Wildtyp-Pflanzen sowie die mit „a“ bezeichneten *ppr54*-Proben). Zur Kontrolle wurden zusätzlich zu der unter (A) gezeigten RT-PCR in einem parallelen Ansatz selektiv gespleißte Moleküle durch Verwendung eines PCR-Oligonukleotids, das die Exon-Exon-Grenze überspannt, amplifiziert und ebenfalls sequenziert (mit „b“ bezeichnete *ppr54*-Proben). Alle Sequenzen belegen eine vollständige Edierung gespleißter Transkripte, auch in *ppr54*-Mutanten wird die Position *ndhA*-3 ediert. Ungespleißte Transkripte sind erwartungsgemäß generell nicht ediert.

3.3.3 Analysen der *ndhA*-Transkriptakkumulation in *ppr54*-Pflanzen

Ogleich die klassische PCR-Methode keine definitiven quantitativen Aussagen erlaubt, ließ bereits die RT-PCR-Analyse der *ndhA*-Transkripte ein verringertes Spleißen der *ndhA*-mRNA in *ppr54*-Mutanten vermuten. Deshalb wurde Gesamt-RNA aus *ppr54*-Mutanten und Wildtyp-Mais gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit drei verschiedenen Sonden hybridisiert, um die Akkumulation gespleißter und ungespleißter *ndhA*-RNA zu ermitteln. Das *ndhA*-Gen ist in einem Operon mit mehreren weiteren *ndh*-Genen und *psaC* kodiert. Das Spleißen erfolgt in polycistronischen Transkripten ebenso wie in bereits endonukleolytisch geschnittenen (del Campo *et al.*, 2000). Transkripte, die mit der Sonde über das erste Exon und der über das Intron zu detektieren waren, waren noch ungespleißt. Nur mit der Exon-Sonde nachzuweisende Transkripte dagegen waren gespleißt. Die Hybridisierungen zeigten ein klar unterschiedliches Transkriptmuster in Mutanten und Wildtypen. Während das freie Intron, die reife *ndhA*-RNA und weitere bereits gespleißte Transkripte in *ppr54*-Mutanten fehlten oder reduziert vorlagen, waren der monocistronische *ndhA*-Vorläufer und längere das *ndhA*-Intron enthaltende Transkripte abundanter als in Wildtyp-Pflanzen (Abb. 34). Somit bestätigten die Northern-Hybridisierungen einen Spleißdefekt in *ppr54*-Mais-Mutanten.

Die Analysen zeigten einen weiteren interessanten Unterschied im Transkriptmuster von *ppr54*-Pflanzen und Wildtypen. Es war eine leichte Verschiebung einer Bande von ca. 3 kb, die mit beiden *ndhA*-Sonden zu detektieren war, festzustellen. Diese RNA war in *ppr54*-Mutanten etwas kürzer (Abb. 34, Kennzeichnung (4)). Eine Hybridisierung mit einer Sonde für das direkt *upstream* von *ndhA* kodierte *ndhH*-Gen zeigte, dass es sich bei dem Transkript um den dicistronischen Vorläufer von *ndhA* und *ndhH* handeln sollte. Die beobachtete Größendifferenz der RNA könnte durch einen Prozessierungsunterschied bedingt werden. In welchem Zusammenhang dies mit dem Entfernen des *ndhA*-Introns stehen könnte, ist nicht abzuleiten.

Insgesamt bestätigten sich in der Untersuchung mit der *ndhH*-Sonde Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten in der Akkumulation polycistronischer Transkripte, welche bereits in den Hybridisierungen mit den *ndhA*-Sonden detektiert werden konnten und somit *ndhA* enthalten. Weitere Unterschiede zeigten sich nicht.

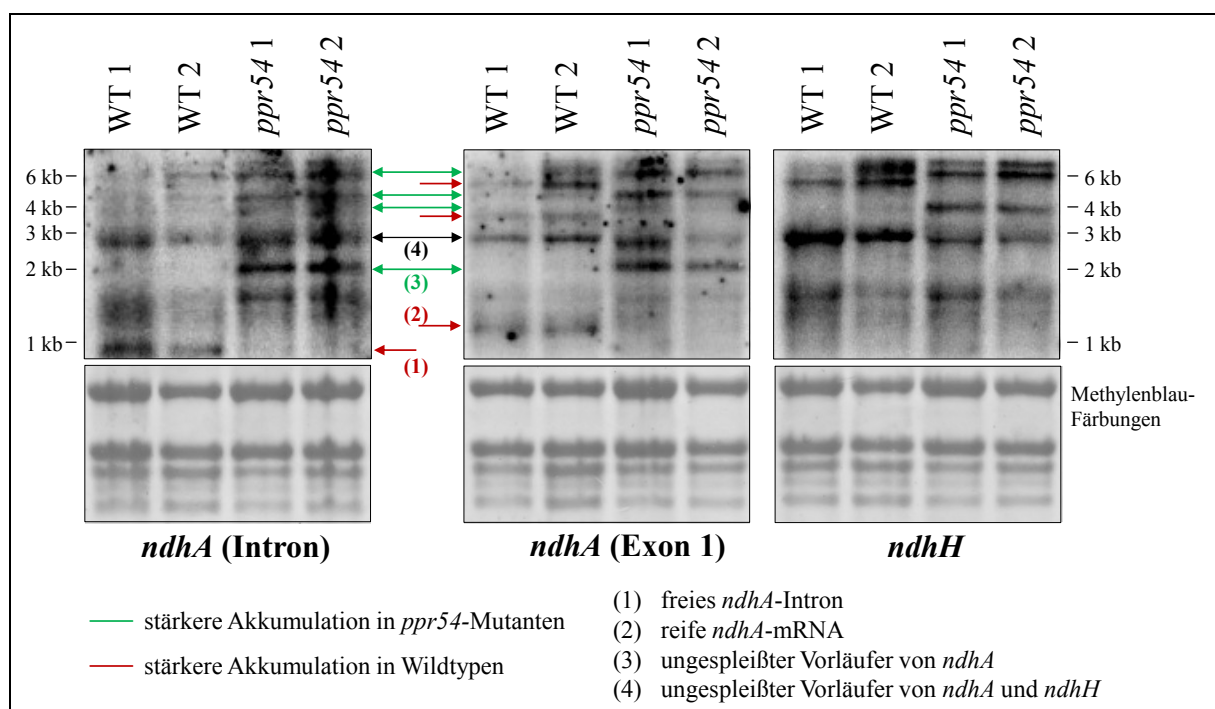


Abb. 34: Das *ndhA*- und *ndhH*-Transkriptmuster in *ppr54*-Mutanten

Es wurden 5 µg Blatt-Gesamt-RNA von Wildtypen (WT) und *ppr54*-Mutanten in 1,2% Agarose-Formaldehydgelen aufgetrennt, auf Hybond-Membranen transferiert und mit Sonden für *ndhA* und *ndhH* hybridisiert. Die Methylenblau-Färbungen der Membranen demonstrieren die RNA-Beladung. Viele Transkripte akkumulieren in Wildtypen und Mutanten in unterschiedlichen Mengen. Die ausschließlich oder verstärkt in Wildtyp-Pflanzen nachzuweisenden Transkripte sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet, die vorwiegend in Mutanten zu detektierenden mit grünen (siehe Legende). Die Richtung der Pfeilspitzen deutet dabei auf die Hybridisierungen, in denen diese Transkripte nachgewiesen wurden. Es ist erkennbar, dass alle in *ppr54*-Pflanzen schwach oder nicht akkumulierenden Transkripte mit entweder der Exon- oder der Intron-Sonde hybridisieren, nicht jedoch mit beiden. In Mutanten fehlen also gespleißte RNA-Spezies sowie das freie *ndhA*-Intron. Ungespleißte Transkripte sind dagegen abundanter, sie werden nicht durch Spleißvorgänge umgesetzt. Bei dem mit einem schwarzen Doppelpfeil gekennzeichneten Transkript handelt es sich um den ungespleißten, dicistronischen Vorläufer von *ndhA* und *ndhH*, der in *ppr54*-Mutanten etwas schneller im Agarosegel läuft, also wahrscheinlich verkürzt ist.

Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Spleißdefekt in *ppr54*-Insertionsmutanten konnte auch in *Arabidopsis*-Mutanten gezeigt werden (M. Tillich, nicht veröffentlicht). PPR54 wird somit in Mais und *Arabidopsis* für das Spleißen des *ndhA*-Introns benötigt. Mit dieser Analyse ist PPR54 das erste PPR-Protein, dessen Funktion in einer ein- und einer zweikeimblättrigen Pflanze untersucht wurde. Die vorgelegten Ergebnisse sind im Einklang mit der These, dass die Funktion von PPR-Proteinen über die lange, eigenständige Evolution von Mono- und Eudikotylen streng konserviert geblieben ist.

4 Diskussion

Der RNA-Metabolismus der Chloroplasten ist weit komplexer als der ihrer bakteriellen Ahnen und zahlreiche im Zellkern kodierte RNA-bindende Faktoren müssen in die Organellen importiert werden (Maier *et al.*, 2008). Dazu gehören PPR-Proteine, die in Pflanzen die größte Familie von RNA-Bindeproteinen überhaupt bilden (Small und Peeters, 2000; Lurin *et al.*, 2004). Doch von der Vielzahl dieser Proteine waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit erst sehr wenige näher untersucht worden. Deshalb wurde das Protein PPR5 detailliert funktionell in *Zea mays* charakterisiert. Dafür wurde neben einer klassischen Mutantenanalyse die vor kurzem etablierte RIP-Chip-Methode (2.2.19) genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass PPR5 in Mais notwendig für die Akkumulation einer spezifischen tRNA und somit für die plastidäre Translation ist. Eine interessante Problematik im Zusammenhang mit der Betrachtung von plastidären PPR-Proteinen wie PPR5 ist die Beobachtung, dass die chloroplastidäre Genexpression von unterschiedlicher Bedeutung für die Embryonalentwicklung in ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen zu sein scheint und in *Arabidopsis*, anders als in Mais, zahlreiche plastidäre PPR-Proteine essentiell für die Embryogenese sind (Stern *et al.*, 2004). Wie unter 4.3.1 näher ausgeführt werden wird, trägt die genaue Kenntnis der Funktion von PPR5 dazu bei, dieses Phänomen zu verstehen.

Entscheidend für einen Vergleich der Auswirkungen von *knockouts* von PPR-Genen in Mono- und Eudikotylen ist es auch, der grundsätzlichen Fragestellung nach der Funktion orthologer PPR-Proteine in monokotylen und dikotylen Pflanzen nachzugehen. Ihr widmet sich diese Arbeit mit der Charakterisierung von PPR54 in Mais. Dabei ist erstmals ein experimenteller Beleg erbracht worden, dass ein PPR-Protein in *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* eine konservierte Funktion ausübt.

Um ein generelles Verständnis der Evolution von PPR-Proteinen, gerade in Bezug auf ihre Abundanz in höheren Pflanzen, erlangen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Frage gestellt, ob sich bzgl. der Funktionen oder RNA-Liganden nahe verwandter PPR-Proteine innerhalb der selben Art eine Konservierung erkennen lässt. Mit der Identifikation und ersten Analyse von PPR-Mutanten einer kleinen Gruppe paraloger PPR-Gene in Mais wurde die Voraussetzung für zukünftige, weitergehende Charakterisierungen geschaffen, welche die Funktionen dieser paralogen PPR-Proteine aufdecken und die Erforschung der PPR-Proteine insgesamt voranbringen können.

4.1 PPR5 stabilisiert den ungespleißten Vorläufer einer plastidären tRNA in Mais

Nach derzeitigem Kenntnisstand werden PPR-Proteine im organellären RNA-Metabolismus für eine Reihe von RNA-Prozessierungsschritten benötigt. Die spezifischen Defekte von PPR-Mutanten deuten dabei darauf hin, dass PPR-Proteine definierte Ziel-Transkripte binden und deren Prozessierung oder Akkumulation beeinflussen. Doch nur in sehr wenigen Fällen konnte bisher direkt die Assoziation von PPR-Proteinen mit den RNA-Molekülen, deren Biogenese in den PPR-Mutanten beeinträchtigt ist, *in vivo* experimentell nachgewiesen werden (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005b, 2006; Gillman *et al.*, 2007). Durch Nutzung der RIP-Chip-Technik und mit Hilfe von *slot blot*-Analysen war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich, Transkripte des plastidären Gens für die tRNA-Glycin (UCC) als primäre Interaktionspartner von PPR5 zu ermitteln (Abb. 10). Eine Charakterisierung dieser Transkripte durch Northern-Analysen ergab, dass es die ungespleißten tRNA-Vorläufer sind, mit denen PPR5 *in vivo* assoziiert ist (Abb. 11). Die auf Immunoprecipitation beruhenden Studien wurden durch Mutantenanalysen ergänzt. Es konnte gezeigt werden, dass in *ppr5*-Mutanten der tRNA-Glycin-Vorläufer stark reduziert ist (Abb. 14). Zwei ursächliche Defekte könnten dies bedingen: eine fehlende Transkription des *trnG-UCC*-Lokus oder eine mangelnde Stabilität der RNA. Durch *run on*-Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Transkription in *ppr5*-Pflanzen nicht beeinträchtigt ist (Abb. 17). Das bedeutet, PPR5 ist für die Stabilität der Vorläufer der tRNA-Glycin (UCC) notwendig. Bei der Charakterisierung der Transkriptabundanz der tRNA-Glycin in *ppr5*-Mutanten wurde ein in seinem 3'-Bereich verkürztes Transkript, welches in *ppr5-2*-Mutanten verstärkt akkumuliert, und ein zweites Produkt der tRNA-Degradation detektiert (Abb. 14 und 18). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass PPR5 die ungespleißte plastidäre tRNA-Glycin stabilisiert, indem das Protein eine Endonuklease-sensitive Stelle im Intron der tRNA besetzt. Mit PPR5 wurde erstmals ein PPR-Protein beschrieben, das für die Biogenese einer tRNA benötigt wird.

Doch weshalb wurden bei der Kartierung des 5'-Endes der tRNA-Glycin in *ppr5*-Mutanten, anders als in Wildtypen, keine primären Transkriptenden identifiziert (Abb. 16)? Es wurden nicht ungespleißte Vorläufer, sondern bereits gespleißte tRNAs analysiert und bei diesen die primären Enden nachgewiesen. Aufgrund ihrer stabilen Sekundärstruktur sind reife tRNAs potentiell sehr langlebig (Li *et al.*, 2002; Deutscher, 2003). Somit wäre anzunehmen – unabhängig davon, ob es zu einem permanenten Verlust neuer tRNA-Vorläufer durch Abbau käme

oder ob keine neuen Transkripte gebildet würden – dass der Anteil älterer und damit bereits endprozessierter tRNA-Moleküle innerhalb der wenigen in *ppr5*-Mutanten nachzuweisenden gespleißten Transkripte der tRNA-Glycin verhältnismäßig hoch ist.

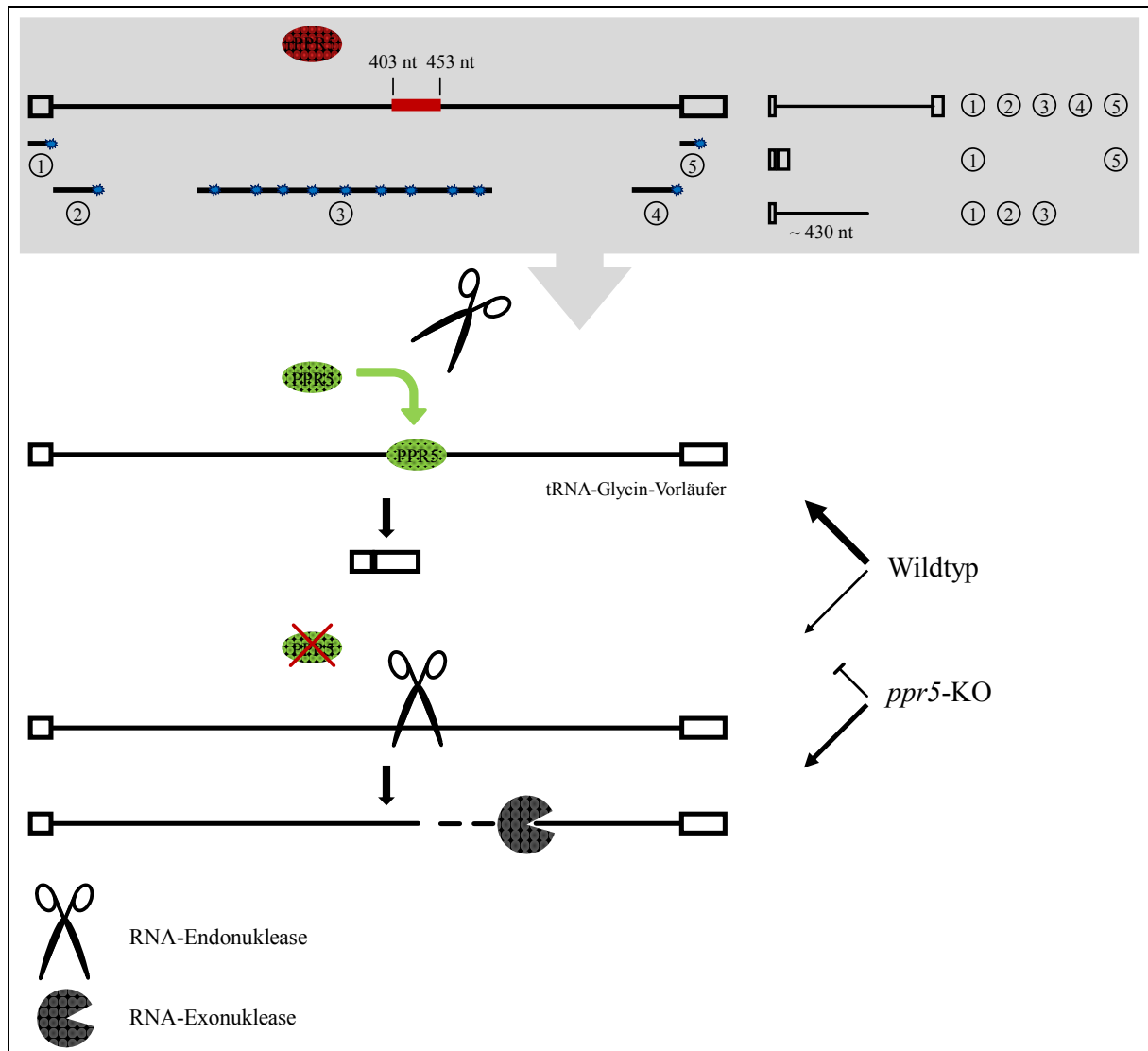


Abb. 35: Modell zur Schutzfunktion von PPR5

Das grau unterlegte Feld zeigt den Sequenzabschnitt der plastidären tRNA-Glycin (UCC), welchen rPPR5 bindet (oben, Williams-Carrier *et al.*, 2008) sowie die hier in Northern-Hybridisierungen verwendeten Sonden und detektierten Transkripte (rechts). Daraus wurde ein Funktionsmodell für PPR5 in Mais abgeleitet, wonach PPR5 direkt im Intron der tRNA-Glycin bindet und so eine RNase-sensibile Stelle vor einem endonukleolytischen Schnitt schützt. Die Stabilität des ungespleißten tRNA-Vorläufers ist auch die Voraussetzung für die Generation der reifen tRNA. Moleküle, die nicht durch Assoziation mit PPR5 geschützt werden, werden geschnitten. Das resultierende 5'-Fragment akkumuliert, während die 3'-RNA exonukleolytisch abgebaut wird. Dies passiert auch mit einem kleineren Teil der Vorläufer der tRNA-Glycin in Wildtypen (symbolisiert durch die Breite des Pfeils). Ohne PPR5 können Vorläufer und reife tRNA nicht akkumulieren.

Parallel zu den hier vorgestellten Arbeiten wurde von der Arbeitsgruppe Barkan (Universität Oregon, USA) PPR5 rekombinant exprimiert (rPPR5) und die Bindestelle des Proteins *in vitro* bestimmt. Dabei wurde eine starke Präferenz von rPPR5 für einzelsträngige RNA und keine Assoziation mit einzel- oder doppelsträngiger DNA nachgewiesen (Williams-Carrier *et al.*, 2008). Das bestätigt den Befund, dass PPR5 kein Transkriptionsfaktor ist. Das Protein zeigte eine hohe spezifische Affinität zu einem RNA-Oligomer, welches die Nukleotide 403 bis 453 der tRNA-Glycin enthielt. Einzelne Nukleotid-Substitutionen oder das Verkürzen dieses Oligomers um wenige Nukleotide an seinem 3'- bzw. 5'-Ende setzten die Bindungsaffinität bereits deutlich herab (Williams-Carrier *et al.*, 2008). Diese *in vitro*-Daten sind im Einklang mit der in der vorliegenden Arbeit *in vivo* gezeigten Interaktion von PPR5 mit Vorläufern der tRNA-Glycin (UCC). Damit ist PPR5 derzeit das einzige PPR-Protein, für das *in vitro*-Bindestudien und *in vivo*-Analysen vorliegen. Die präzise Kartierung der PPR5-Bindestelle im genannten Bereich im Intron der tRNA fügt sich darüber hinaus stimmig in die entworfene Hypothese einer Schutzfunktion von PPR5. Denn anhand ihrer Länge von etwa 430 nt ist davon auszugehen, dass das 3'-Ende der in Northern-Experimenten nachgewiesenen partiell degradierten RNA (Abb. 14) direkt im Bereich der PPR5-Bindestelle zu lokalisieren ist. Weitere Northern-Hybridisierungen von Williams-Carrier *et al.* (2008) belegen diese Folgerung. Somit stimmt die Position einer Ribonuklease-sensitiven Stelle im Intron der tRNA mit jenem Sequenzabschnitt, den PPR5 bindet, überein. Da das Fehlen von PPR5 in einem Verlust der ungespleißten tRNA-Glycin und der verstärkten Bildung eines Degradationsprodukts resultiert, scheint die Bindung von PPR5 die Akkumulation des tRNA-Vorläufermoleküls, und daraus folgend auch der reifen tRNA, zu bedingen. Die Abbildung 35 illustriert zusammenfassend die vorgeschlagene Funktionsweise von PPR5 in Mais.

4.1.1 PPR-Proteine als Schutzfaktoren organellärer Transkripte

PPR-Proteine erfüllen eine Reihe von Funktionen im organellären RNA-Metabolismus (Übersicht in Schmitz-Linneweber und Small, 2008; siehe Einleitung 1.2.3). Neben PPR5 wurden bisher vier weitere PPR-Proteine beschrieben, die für die Stabilität chloroplastidärer Transkripte benötigt werden. PGR3 in *Arabidopsis* stabilisiert den tricistonischen Vorläufer von *petL*, *petG* und *psaJ* (Yamazaki *et al.* 2004). In *Chlamydomonas* schützt MCA1 die *petA*-mRNA durch Assoziation mit der 5'-UTR vor einem exonukleolytischen Abbau (Loiselay *et al.*, 2008) und wahrscheinlich schützt MRL1 in ähnlicher Weise die *rbcL*-mRNA (Johnson *et al.*, 2010). PPR10 ist in Mais essentiell für die Stabilisierung der 3'- und 5'-Termini spezifischer plastidärer mRNAs (Pfalz *et al.*, 2009). Die letztgenannte Studie schlägt, auf der

Funktionsweise von PPR10 fußend, ein grundsätzliches Modell für die intercistronische Prozessierung plastidärer Transkripte vor. Demnach schneiden Endonukleasen plastidäre mRNAs in unstrukturierten, eher AU-reichen Abschnitten mit wenig Sequenzspezifität (Pfalz *et al.*, 2009). Ein Protein mit entsprechender Endoribonuklease-Aktivität wurde mit der Identifikation der RNase E in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Schein *et al.*, 2008; Mudd *et al.*, 2008). Die so generierten Termini werden gemäß Pfalz *et al.* von Exonukleasen attackiert, wenn sie nicht durch Sekundärstrukturen in der RNA oder Proteinfaktoren vor der Degradation geschützt werden, sodass die Position der gebundenen Proteine bzw. der RNA-Stammschleifen die Enden reifer mRNAs definiert. Dass von diesen endonukleolytischen Schnitten insbesondere intercistronische Regionen betroffen sind, erklären die Autoren mit der schützenden Bindung von Ribosomen in translatierten Sequenzbereichen (Pfalz *et al.*, 2009). Auch die Ziel-RNA von PPR5 ist als tRNA-Vorläufer nicht mit Ribosomen assoziiert. Gruppe-II-Introns sollten jedoch aufgrund ihrer hochgradigen Sekundärstruktur (Michel *et al.*, 1989) im Allgemeinen vor Nukleasen geschützt sein. Dennoch erscheint, bei einer geringen Sequenzspezifität von plastidären Endoribonukleasen, das Vorhandensein von RNase-sensitiven Sequenzbereichen in Introns, wie es für das tRNA-Glycin-Intron in dieser Arbeit vorgeschlagen wurde, höchst plausibel. Ganz ähnlich wie PPR5 ist auch das PPR-Protein PET309 in den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* für die Stabilität von RNA-Vorläufer-Molekülen notwendig, welche Gruppe-II-Introns enthalten. In der Abwesenheit von PET309 können Transkripte von Introns aufweisenden *cox1*-Allelen nicht akkumulieren. Doch *pet309*-Mutanten eines Stamms, der ein Intron-freies *cox1*-Gen kodiert, zeigen keinen Defekt in der Akkumulation der *cox1*-RNA (Manthey und McEwen, 1995).

Die Beispiele demonstrieren, dass die Stabilisierung von organellären Transkripten zu den wesentlichen Funktionen von PPR-Proteinen gehört, wobei bisher Mechanismen beschrieben wurden, bei denen entweder intergenische Sequenzen oder Introns der Liganden vor einer nukleolytischen Degradation durch Interaktion mit dem PPR-Protein geschützt werden. Interessanterweise gehören alle derzeit bekannten stabilisierenden PPR-Faktoren zu den Proteinen des P-Typs, den phylogenetisch ältesten und innerhalb der Eukaryoten weit verbreiteten PPR-Proteinen (Lurin *et al.*, 2004; siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.2). Die Mehrheit der PPR-Proteine weist keine katalytischen Domänen auf, weshalb vorgeschlagen wurde, dass sie in der Regel als Adaptoren fungieren, die die Interaktion von spezifischen RNA-Zielen und weiteren Proteinen mit enzymatischer Aktivität vermitteln (Lurin *et al.*, 2004). Die hier beschriebene Schutzfunktion von PPR5 beruht jedoch auf der reinen Assoziation mit einer

RNA und erfordert, aller Wahrscheinlichkeit nach, keine zusätzlichen Faktoren. Diese einfache und, im Vergleich zu RNA-Prozessierungsschritten wie Spleißen oder Edieren, passive Funktion könnte somit einer für P-Typ-PPR-Proteine ursprünglichen Wirkungsweise entsprechen.

In der Einleitung dieser Arbeit wurden zwei alternative Hypothesen, welche die Expansion der PPR-Proteine in höheren Pflanzen und die grundsätzliche Rolle dieser Proteine in den Organellen zu erklären versuchen, vorgestellt. Zum einen könnten sie Faktoren darstellen, die Gen-spezifisch die plastidäre und mitochondriale Genexpression regulieren. Der zweite Ansatz schlägt vor, dass sie Mutationen in den organellären Genomen kompensieren, indem sie die Funktionalität der Genprodukte auf der Transkript-Ebene wieder herstellen (Schmitz-Linneweber und Small, 2008; Maier *et al.*, 2008). Mit welcher dieser Ideen lässt sich das Modell für die Funktion von PPR5 in Einklang bringen? Viele plastidäre Gene sind in Operons organisiert und werden in langen polycistronischen Vorläufern transkribiert. Damit ergibt sich die Notwendigkeit, die relative Akkumulation der verschiedenen Transkripte posttranskriptionell zu regulieren. Im Fall von PPR10 könnte die Bindestelle des Proteins dabei die Länge der UTR-Sequenzen und dementsprechend die Wahrscheinlichkeit für endonukleolytische Schnitte bedingen. PPR10 würde so entscheidend die Stöchiometrie der Transkripte stromabwärts bzw. -aufwärts der Bindestelle determinieren (Pfalz *et al.*, 2009). Der *trnG-UCC*-Lokus in Mais jedoch wird als Monocistron transkribiert (Watkins *et al.*, 2007, Ergebnisse dieser Arbeit). So scheint es naheliegender, die Funktion von PPR5, den Schutz einer Ribonuklease-sensitiven Stelle im Intron eines Vorläufer-Transkripts, als Korrektur eines plastidären Defekts durch den Zellkern zu interpretieren. Beispielsweise könnte sich eine ursprünglich vorhandene Sekundärstruktur durch eine Punktmutation so verändert haben, dass das tRNA-Intron in diesem Sequenzbereich einem Schnitt durch Nukleasen zugänglich geworden ist. Tatsächlich könnten sogar PPR-Proteine, die die Termini von mRNAs durch ihre schützende Bindung definieren, einen Verlust von in den UTR-Sequenzen ursprünglich vorhandenen, stabilisierenden Stammschleifen kompensieren.

4.1.2 Eine duale Funktion von PPR5 in der Biogenese der tRNA-Glycin (UCC)

Die Funktion von PPR5 in der Stabilisierung der ungespleißten tRNA-Glycin und damit einhergehend die dramatische Reduktion dieses Moleküls in *ppr5*-Mutanten erklären hinreichend das Fehlen der reifen tRNA in den Mutanten. Nichtsdestotrotz wäre darüber hinaus eine Beteiligung von PPR5 am Spleißen des Introns der tRNA-Glycin denkbar. In der

in vitro kartierten PPR5-Bindestelle befinden sich zwei für Gruppe-II-Introns charakteristische Elemente: das eine Intron-interne Sequenzpaarung eingehende α' Motiv sowie EBS1 (*exon binding site* 1), ein Element, das komplementär zur IBS1 Sequenz (*intron binding site* 1) im ersten Exon ist und diese für die Bildung der 5'-Spleißstelle bindet (Williams-Carrier *et al.*, 2008). Ungewöhnlicherweise liegt die EBS1 im Intron der tRNA-Glycin gemäß Vorhersagen partiell in stabilen Doppelstrangpaarungen einer Haarnadelschleife vor. So wurde von Williams-Carrier *et al.* (2008) vorgeschlagen, dass die Assoziation von PPR5 mit Sequenzbereichen, welche die EBS1 umgeben, die Auflösung der Haarnadelstruktur begünstigt. Das könnte eine für den Spleißprozess notwendige Interaktion von EBS1 und IBS1 ermöglichen oder zumindest unterstützen (Williams-Carrier *et al.*, 2008).

Experimentelle Belege für eine Beteiligung von PPR5 am Spleißen des Introns der tRNA-Glycin wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels *poisoned primer extension*-Analysen erbracht. Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis von gespleißten zu ungespleißten Transkripten in *ppr5*-Mutanten niedriger als in Wildtypen ist (Abb. 15B). Dennoch waren die Signale für reife Transkripte auch in den Mutanten sehr intensiv und deutlich stärker als für die tRNA-Glycin-Vorläufer. In Spleißmutanten wie *ppr4* und *otp51* dagegen konnten gespleißte Transkripte nahezu nicht mehr durch *poisoned primer extension*-Analysen nachgewiesen werden (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; Falcon de Longevialle *et al.*, 2008). Zu berücksichtigen ist dabei, dass in den genannten Arbeiten mRNAs analysiert wurden, die sich in ihrem RNA-Metabolismus von dem einer tRNA unterscheiden. Zudem handelte es sich bei den für die *poisoned primer extension*-Analyse genutzten *ppr5*-2-Pflanzen um hypomorphe Mutanten, die auch in der Akkumulation der tRNA-Glycin (UCC) weniger schwere Defekte aufwiesen (Abb. 14). Interessanterweise konnte mit Antikörpern gegen die charakterisierten tRNA-Glycin-Spleißfaktoren CAF1 und RNC1 (Ostheimer *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2007) PPR5 koprizipitiert werden und andersherum wurden diese beiden Proteine in PPR5-Präzipitaten nachgewiesen (R. Williams-Carrier, siehe Beick *et al.*, 2008). Eine Beteiligung von PPR5 am Spleißen des Introns belegt das nicht, es zeigt jedoch, dass sich die Interaktion von PPR5 mit dem Intron der tRNA-Glycin zeitlich mit dessen Assoziation mit CAF1 und RNC1 überschneidet. Zukünftig könnte beispielsweise über *yeast two hybrid*-Analysen oder mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation untersucht werden, ob PPR5 direkt mit den Proteinen CAF1 bzw. RNC1 interagiert. Sollte das zutreffen, ist eine Spleißfunktion von PPR5 wahrscheinlich.

Alles in allem legen die Ergebnisse der *poisoned primer extension*-Analyse und der Bestimmung der Bindestelle des rekombinant exprimierten PPR5 von Williams-Carrier und

Barkan (2008) bereits nahe, dass PPR5 zusätzlich zu seiner Funktion in der Stabilisierung des ungespleißten Transkripts eine assistierende Rolle im Spleißen des Introns der tRNA-Glycin zukommt. Dabei könnte erneut gelten, dass das Fehlen einer für den Metabolismus der RNA entscheidenden, in diesem Fall einzelsträngigen, RNA-Sekundärstruktur durch die Assoziation mit einem PPR-Protein „korrigiert“ wird.

4.2 Die Funktion von orthologen PPR-Proteinen in Angiospermen

4.2.1 Die Funktion von PPR54 ist konserviert in *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays*

In der Evolution der Angiospermen begann vor ca. 150 Mio. Jahren die eigenständige Entwicklung der einkeimblättrigen Pflanzen (Chaw *et al.*, 2004). Dennoch sind die meisten PPR-Gene in der Monokotylen Reis und der Eudikotylen *Arabidopsis thaliana* als orthologe Paare existent, während dies für andere große Genfamilien in Angiospermen nicht zutrifft. Der Ursprung der überwiegenden Mehrheit der PPR-Gene in Mono- und Eudikotylen geht demnach zumindest auf ihren letzten gemeinsamen Vorfahren zurück (O'Toole *et al.*, 2008). Später kam es sowohl innerhalb der zu *Arabidopsis* als auch innerhalb der zu Reis führenden Linie zu mehreren Chromosomen- und Genomduplikationen (Bowers *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005), was zu zahlreichen paralogenen PPR-Genen in beiden Linien geführt haben muss. Sie gingen interessanterweise vielfach wieder verloren (O'Toole *et al.*, 2008).

Diese bemerkenswerte Konservierung der PPR-Genfamilie innerhalb der Angiospermen lässt nicht nur auf die Essentialität der kodierten Proteine schließen, sondern auch vermuten, dass orthologe PPR-Proteine die gleiche Funktion in monokotylen und eudikotylen Pflanzen ausüben (O'Toole *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz bedarf die Frage nach der Funktion orthologer chloroplastidärer PPR-Proteine in ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen einer experimentellen Klärung. So wurde im Rahmen dieser Arbeit das Protein PPR54 in Mais für eine Charakterisierung mittels Mutantenanalyse gewählt, da bereits bekannt war, dass NtPPR54 in Tabak mit hoher Affinität ein *ndhA*-Fragment aus Spinat, welches 13 nt des ersten und 27 nt des zweiten *ndhA*-Exons umfasst, bindet und dass in *Arabidopsis thaliana* *ppr54*-Mutanten einen *ndhA*-Spleißdefekt aufweisen (M. Tillich, nicht veröffentlicht). Es konnte das *ppr54*-Gen in Mais identifiziert und eine Linie mit einer Mu-Transposon-Insertion in der 5'-UTR dieses Gens isoliert werden (Abb. 31 und 32). In der Linie segregierten Pflanzen mit hellgrünem Phänotyp, der strikt mit dem Genotyp der homozygoten Insertion

korrelierte, weshalb die Transposon-Insertion sehr wahrscheinlich die Ursache des Chlorophyll-Defizits ist. Zudem lässt die Nähe des Mu-Elements zum Startkodon des *ppr54*-Gens eine Beeinträchtigung der *ppr54*-Expression durch die Mutation annehmen. Zukünftig sollten Komplementationsanalysen mit einer zweiten *ppr54*-Mutantenlinie durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass der *ppr54*-Genotyp den Phänotyp bedingt.

Durch Northern-Analysen konnte in den isolierten Mais-Mutanten ein Defekt im Spleißen des *ndhA*-Introns nachgewiesen werden. Während ungespleißte Transkripte in den Mutanten verstärkt akkumulierten, waren gespleißte sowie das freie Intron massiv reduziert (Abb. 34). Auch in RT-PCR-Experimenten zeigte sich in *ppr54*-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp eine deutlich geringere Abundanz gespleißter Transkripte im Verhältnis zu ungespleißten (Abb. 33A). Dieser molekulare Phänotyp weist klar auf eine Funktion von PPR54 im Spleißen von *ndhA*-Transkripten in Mais hin, denn nur so lässt sich das Fehlen der gespleißten Transkripte bei einer gleichzeitigen Überakkumulation der ungespleißten erklären. Da sehr ähnliche Defekte in *ppr54*-Mutanten von *Arabidopsis* beobachtet wurden (M. Tillich, unveröffentlicht), ist diese Funktion des PPR-Proteins zwischen zwei phylogenetisch so weit voneinander entfernten Pflanzen konserviert. Es ist deshalb anzunehmen, dass das Spleißen des *ndhA*-Introns auch in anderen Angiospermen eine Funktion des Proteins PPR54 ist. Während die vorliegende Dissertation abgeschlossen wurde, wurde die Charakterisierung des PPR-Proteins MRL1 von *Chlamydomonas reinhardtii* publiziert, welches in der Grünalge essentiell für die Stabilität der *rbcL*-mRNA ist. Anders als für die anderen zehn PPR-Proteine aus *Chlamydomonas* können für MRL1 putative Orthologe mit hochkonservierter Sequenz in Pflanzen identifiziert werden. Auch in *Arabidopsis* zeigen *mrl1*-Mutanten eine verminderte Abundanz der *rbcL*-mRNA. Obgleich sich die Schwere des Defekts und seine Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Photosynthese in den Mutanten deutlich unterscheidet, ist das Ziel-Transkript dieses PPR-Proteins somit zwischen der Grünalge und der Samenpflanze konserviert (Johnson *et al.*, 2010). Zusammen mit den hier vorgelegten PPR54-Daten und den AtPPR54-Analysen von M. Tillich legt dies den Schluss nahe, dass im Allgemeinen die Existenz von orthologen PPR-Proteinen auf eine konservierte Funktion dieser Proteine, insbesondere auf eine identische Spezifität für ihre RNA-Interaktionspartner, in den verschiedenen Organismen hinweist.

Weder in Mais noch in *Arabidopsis* können weitere Funktionen von PPR54, über das Spleißen der *ndhA*-mRNA hinaus, ausgeschlossen werden. Generell interagieren PPR-Proteine mit wenigen spezifischen RNA-Liganden, es gibt jedoch mehrere Proteine, für die eine Funktion für zwei oder drei plastidäre Transkripte nachgewiesen wurde (u. a. Chateigner-Boutin *et al.*, 2008; Fisk *et al.*, 1999; Okuda *et al.*, 2009; Pfalz *et al.*, 2009). Zudem wäre denkbar, dass PPR54 in weiteren Prozessen des RNA-Metabolismus von *ndhA*-Transkripten benötigt wird, so wie PPR5 in Mais nicht nur die Stabilisierung des tRNA-Glycin-Vorläufers gewährleistet, sondern wahrscheinlich auch dessen Spleißen beeinflusst (siehe 4.1.2). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass sich das Laufverhalten des ungespleißten, dicistronischen *ndhH-ndhA*-Transkripts in Agarosegelen bei *ppr54*-Mais-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen unterschied. Das könnte auf eine Beteiligung von PPR54 an der Endprozessierung des Transkripts hinweisen. Eine Kartierung der *ndhH-ndhA*-Enden in *ppr54*-Mutanten, wie sie für die tRNA-Glycin in *ppr5*-Pflanzen durchgeführt wurde (Abb. 16), könnte helfen, diese Frage zu klären.

4.2.2 Der Einfluss von PPR54 auf die Edierung von *ndhA-3* in Mais und Tabak

Eine zusätzliche Funktion von PPR54 für die Edierung der Stelle *ndhA-3* schien naheliegend, da das PPR54-Orthologe als einziges Protein aus Tabak als Interaktionspartner eines Fragments aus Spinat, das exakt die Edierungsstelle umgibt, isoliert werden konnte (M. Tillich, nicht veröffentlichte Daten). Zwar existiert die Edierungsstelle in Tabak, anders als in Mais und Spinat, *in vivo* nicht, dennoch ist aus Chloroplasten-Transformationsexperimenten bekannt, dass auch in diesem Organismus ein zur Edierung der Stelle befähigter Faktor vorhanden sein muss (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2001). Sollte PPR54 bzw. NtPPR54 den Edierungsfaktor repräsentieren, würde seine Funktion für das Entfernen des *ndhA*-Introns erklären, warum dieser Faktor trotz des Verlusts der Edierungsstelle, also ohne einen entsprechenden Selektionsdruck, in Tabak noch immer vorhanden und funktionell ist. So wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Mais-Mutanten die Edierung der Stelle *ndhA-3* quantitativ analysiert. In *ppr54*-Mutanten waren die gespleißten Transkripte, ebenso wie in Wildtypen, vollständig ediert, ungespleißte Transkripte blieben generell unediert (Abb. 33B). Somit deutet nichts darauf hin, dass PPR54 in den Chloroplasten von Mais für die Edierung von *ndhA-3* notwendig ist. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die in den verwendeten Transposon-induzierten Mutanten vorkommenden Mu-Elemente mobil sind und ihre Insertionsstelle durch Transposition verlassen können. Auf diese Weise entstehen kleinere somatische Sektoren, die auf Zellen zurückgehen, in denen die ursprüngliche Insertion nicht

mehr vorliegt und *ppr54* normal exprimiert wird. Es kann demzufolge nicht zweifelsfrei beurteilt werden, ob die RT-PCR-Amplifikate aus *ppr54*-Mutanten, welche auf ihren Edierungsstatus analysiert wurden, von Transkripten dieser wildtypischen Sektoren stammen oder ob sie das Resultat einer trotz der *ppr54*-Mutation verbliebenen, minimalen Spleiß-aktivität sind.

PPR54 ist ein Protein des P-Typs (siehe 3.3.1), alle bisher beschriebenen chloroplastidären PPR-Proteine mit einer Edierungsfunktion jedoch gehören der Gruppe der PLS-Typ-PPR-Proteine an und es wird vermutet, dass E-Domänen für das Rekrutieren einer Desaminase notwendig sind, welche eventuell durch eine DYW-Domäne – in *cis* oder *trans* wirkend – zur Verfügung gestellt werden könnte (Salone *et al.*, 2007; Okuda *et al.*, 2009; siehe Einleitung Kapitel 1.2.3). Kürzlich wurde allerdings ein mitochondriales PPR-Protein des P-Typs beschrieben, das in *Arabidopsis thaliana* an der Modulation partieller Edierungen beteiligt sein soll. Dabei wurde mittels Mutantenanalysen gezeigt, dass das Fehlen des Proteins zu einem verstärkten Edieren führt (Doniwa *et al.*, 2010). Interessanterweise konnte ähnliches in transgenem Tabak für PPR54 beobachtet werden. Die Transkripte von in Chloroplasten eingebrachten Konstrukten, welche Abschnitte des ersten und zweiten *ndhA*-Exons mit der Edierungsstelle aus Spinat (*ndhA-3* in *Zea mays* entsprechend) enthielten, wurden in *Ntppr54*-RNAi-Linien zu einem höheren Prozentsatz ediert als in anderen Tabak-Linien (M. Tillich, nicht veröffentlichte Daten). Da die Edierungsstelle *ndhA-3* in unmittelbarer Nähe der Intron-Exon-Grenze positioniert ist, wäre eine Überlagerung des Erkennungsmotivs für die Edierungsstelle mit jenen Sequenzbereichen, mit denen Spleißfaktoren assoziiert sind, zu erwarten. Edierungs- und Spleißproteine könnten somit um diesen Transkriptabschnitt konkurrieren. *In vivo* werden ausschließlich gespleißte und damit aus dem Spleißkomplex freigesetzte *ndhA*-Transkripte ediert, möglicherweise besteht sogar die Notwendigkeit, dass die beiden Exons zueinander gelangen, um ein für die Erkennung durch *trans*-Faktoren erforderliches *cis*-Element zu bilden (del Campo *et al.*, 2000; Abb. 33B). Bzgl. des artifiziellen Edierungssystems in Tabak wäre denkbar, dass NtPPR54, welches nachweislich mit dem eingebrachten Sequenzbereich assoziieren kann, die Edierungsstelle besetzt, weshalb in Linien mit einer verminderten *Ntppr54*-Expression eine effizientere Edierung stattfinden kann. PPR54 würde demnach nicht für eine Modulation der Edierungsrate notwendig sein, sondern lediglich als Spleißfaktor mit der RNA-Edierung interferieren (siehe Modell Abb. 36). In *ppr54*-Mais-Mutanten zeigt sich weder eine verminderte, noch eine verstärkte Edierung. Auch in Mais-Wildtypen wird *ndhA-3* nicht wie im Tabak-System partiell, sondern

vollständig ediert. Zusammengefasst ist festzustellen, dass sowohl die Analysen der Mais-Mutanten, als auch die der transgenen Tabak-Pflanzen nicht auf PPR54 als Edierungsfaktor der *ndhA*-Transkripte hinweisen. Ein anderes chloroplastidäres Protein als PPR54, das mit dem putativen *cis*-Element dieser plastidären Edierungsstelle interagiert, wurde in den Analysen von M. Tillich jedoch nicht identifiziert.

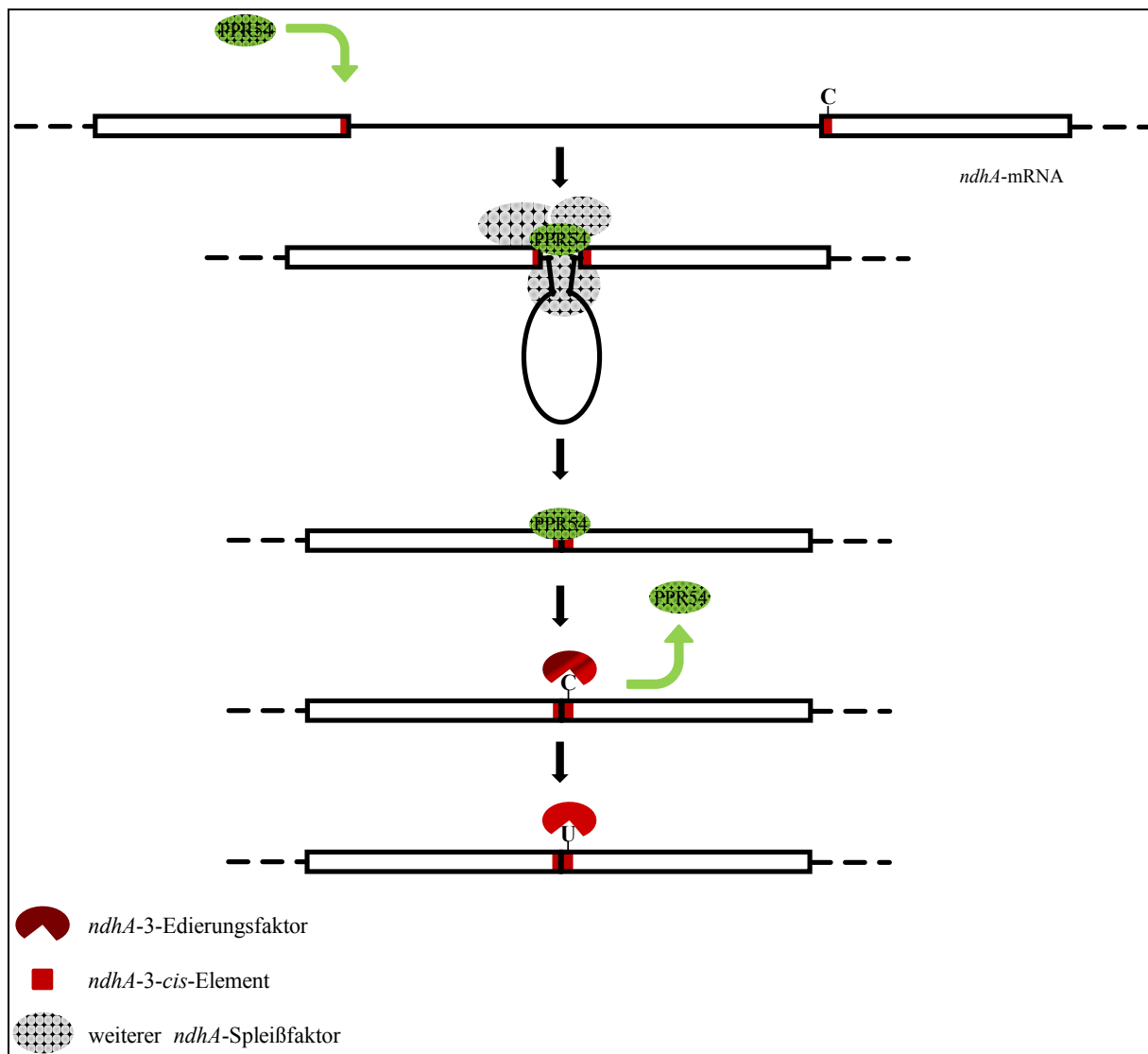


Abb. 36: Modell zur Interferenz vom Spleißen und Edieren der *ndhA*-Transkripte und zur Rolle von PPR54

Dieses Modell schlägt vor, dass PPR54, zusammen mit anderen Spleißfaktoren, mit ungespleißter *ndhA*-RNA assoziiert. Dies geschieht sowohl bei mono- als auch bei polycistronisch vorliegenden Transkripten, symbolisiert durch die gestrichelten Linien im 5'- und 3'-Bereich. Nach dem Spleißen dissoziiert PPR54 von den reifen Transkripten, was die Anlagerung eines unbekannten Edierungsfaktors ermöglicht. Die in beiden Exons befindlichen Teilsequenzen eines *cis*-Elements sind durch das Entfernen des Introns zusammengeführt worden und können so von einem spezifischen *trans*-Faktor erkannt werden.

4.3 Phänotypen von PPR-Mutanten in *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays*

Es gibt gute Belege für eine konservierte Funktion orthologer PPR-Proteine in *Arabidopsis* und Mais im RNA-Metabolismus der Chloroplasten (O'Toole *et al.*, 2008; diese Arbeit, siehe Abschnitt 4.2.1). Dennoch haben Mutationen in den PPR-Genen plastidär lokalisierter PPR-Proteine in beiden Pflanzenarten oft sehr unterschiedliche Phänotypen zur Folge. So zeigen auf der einen Seite Nullmutanten der PPR-Gene *Atppr4*, *Atppr2*, *Atppr5* und *Atppr51* einen frühzeitigen Abbruch der Embryonalentwicklung, während die Nullmutanten in *Zea mays* zur Keimung befähigte, albinotische Mutanten sind, die ca. drei Wochen überleben können (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006; www.seedgenes.org; Williams und Barkan, 2003; Cushing *et al.*, 2005; diese Arbeit: Abbildungen 12A, 24, 26C und D). Auf der anderen Seite sind *Atppr54*-T-DNA-Insertionsmutanten nicht von Wildtypen zu differenzieren (M. Tillich, nicht publiziert), *ppr54*-Mais-Mutanten dagegen zeigen eine leichte Chlorophyll-Defizienz (Abb. 32). Die Ursachen für den unterschiedlichen Einfluss von wahrscheinlich sehr ähnlichen Defekten im plastidären RNA-Metabolismus auf die Vitalität von *Arabidopsis*- und Mais-Pflanzen werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Bedeutung der plastidären Translation für die Embryogenese in Eudikotylen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PPR4 in Mais notwendig für das *trans*-Spleißen der ein ribosomales Protein kodierenden *rps12*-mRNA ist (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2006), wurde in der vorliegenden Arbeit mit PPR5 ein zweites PPR-Protein im Detail in Mais charakterisiert, dessen *Arabidopsis*-Ortholog essentiell für die Embryonalentwicklung ist. In Mais ist PPR5 notwendig für die Akkumulation der tRNA-Glycin (UCC), eine von zwei Isoakzeptor-tRNAs. Die tRNA-Glycin (GCC) dagegen war nicht in PPR5-Komplexen zu identifizieren und sie akkumulierte in normalen Mengen in *ppr5*-Mutanten (Abb. 10 und 14). Die 30 tRNAs, welche in den Chloroplasten-Genomen der Angiospermen kodiert werden, genügen aller Wahrscheinlichkeit nach der plastidären Genexpression und sind, durch eine intensive Nutzung des *wobble*-Mechanismus, zur Erkennung aller Kodons befähigt (Über-sichten in Sugiura *et al.*, 1998; Bock, 2007). Die schweren Defekte der *ppr5*-Mutanten in der Akkumulation plastidärer Proteine (Abb. 13) zeigen die Notwendigkeit der tRNA-Glycin (UCC) – und damit von PPR5 – für die Translation in den Chloroplasten. Eine Kompensation des Verlusts der reifen tRNA-Glycin (UCC) durch die zweite plastidäre tRNA-Glycin ist in *Zea mays* offensichtlich nicht möglich.

Ebenso sind PPR2, das wahrscheinlich für die Akkumulation der tRNA-Valin (UAC) und der tRNA-Isoleucin (GAU) benötigt wird (Abb. 28), und PPR51 für die Translation plastidär kodierter mRNAs notwendig (Williams und Barkan, 2003; Abb. 27). Somit spielen die PPR-Proteine PPR4, PPR5, PPR2 und PPR51 in Mais alle eine wesentliche Rolle in der plastidären Proteinsynthese und ihre Orthologen in *Arabidopsis* sind essentiell für die Embryonalentwicklung. Nimmt man eine konservierte Funktion der vier PPR-Proteine in der Translation chloroplastidärer Transkripte an, so scheint diese ihre Notwendigkeit für die Embryogenese in dikotylen Pflanzen wie *Arabidopsis* zu bedingen. Dass ein Ausschalten für die Entwicklung bzw. Funktionalität der Plastiden benötigter Gene in *Arabidopsis* auch die Embryogenese blockiert, ist seit einigen Jahren bekannt (u. a. Uwer *et al.*, 1998; Cushing *et al.*, 2005). Die Charakterisierung von tRNA-Synthetase-KO-Linien identifizierte die plastidäre Translation als für die Embryonalentwicklung in *Arabidopsis* essentiell (Berg *et al.*, 2005). In monokotylen Pflanzen wie Mais und Gerste wird eine Translation in den Plastiden jedoch nicht für die Keimung der Samen benötigt, wie Mutanten wie *iojap* und *albostrians*, denen plastidäre Ribosomen fehlen, zeigen (Walbot und Coe, 1979; Hess *et al.*, 1994; Stern *et al.*, 2004). Die Beschreibung der PPR-Mais-Mutanten mit plastidären Translationsdefekten unterstreicht diese Erkenntnisse. Generalisiert man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der früheren PPR4-Studie, so ist zu schlussfolgern, dass wahrscheinlich in vielen Fällen, in denen das Fehlen von PPR-Proteinen in *Arabidopsis* zu einem Abbruch der Embryogenese führt, die Ursache dafür eine Rolle der entsprechenden PPR-Proteine in der plastidären Translation ist.

Doch weshalb sind Plastiden in Eudikotylen, aber nicht in Monokotylen, relevant für die Entwicklung der Embryonen? Es muss essentielle plastidäre Genprodukte in *Arabidopsis* geben, die in Mais und Gerste fehlen oder durch andere Faktoren ersetzt werden können. Ein Vergleich der Plastome von Monokotylen und Dikotylen offenbart, dass in den Plastidengenomen von Monokotylen die drei Gene *ycf1*, *ycf2* und *accD* nicht bzw. nur als Pseudogene vorkommen, während sie sogar in den rudimentären Plastomen parasitierender dikotyler Pflanzen erhalten geblieben sind (Stern *et al.*, 2004; Hiratsuka *et al.*, 1989; Maier *et al.*, 1995; Funk *et al.*, 2007; McNeal *et al.*, 2007; eine aktuelle Übersicht der zurzeit vollständig sequenzierten Plastome in Diekmann *et al.*, 2009). Das *accD*-Gen kodiert eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase (Wakasugi *et al.*, 2001; Kode *et al.*, 2005). Die Funktionen der ORFs *ycf1* und *ycf2* sind noch unbekannt, obgleich vorgeschlagen wird, dass sie Proteine eines ABC-Transporters respektive der Zellteilung (FtsH-Protease) kodieren (De Las Rivas *et al.*, 2002). Auch eine Ähnlichkeit der YCF1-Proteinsequenz zum *single strand binding*

(SSB) Protein von *E. coli*, welches an der DNA-Reparatur, -Replikation und -Rekombination beteiligt ist, wurde beschrieben (Hiratsuka *et al.*, 1989; Ankele *et al.*, 2005). Gerade diese SSB-ähnliche Region fehlt in den *ycf1*-Pseudogenen der Gräser (Ankele *et al.*, 2005).

In Tabak scheinen die Gene *ycf1*, *ycf2* und *accD* essentiell zu sein, denn durch ballistische Transformation generierte *knockouts* bleiben trotz Selektionsdruck heteroplastomisch (Drescher *et al.*, 2000; Kode *et al.*, 2005). Gleiches gilt für *knockouts* der plastidären Gene *rps18*, *trnC-GCA* und *trnN-GUU*, deren Genprodukte, ein ribosomales Protein und zwei tRNAs, wiederum Komponenten der Genexpression sind (Rogalski *et al.*, 2006; Legen *et al.*, 2007). Auch die Bedeutung der tRNA-Glycin für die Vitalität der Zelle in Tabak wurde in KO-Experimenten kürzlich analysiert. Ein Verlust der tRNA-Glycin (GCC) kann durch sogenanntes *superwobbling* durch die tRNA-Glycin (UCC) kompensiert werden. Letztere selbst ist jedoch unentbehrlich für die zelluläre Lebensfähigkeit (Rogalski *et al.*, 2008). Somit sind in Tabak die Genprodukte von *accD*, *ycf1* und *ycf2* sowie Elemente, die für die Expression dieser Gene benötigt werden, essentiell. Es könnte für alle Eudikotylen gelten, dass Proteine, welche für die Translation der Transkripte der drei plastidären Gene, die in den Plastomen Monokotyler fehlen, notwendig sind, bereits während der Embryogenese unabdingbar sind.

Ob ein Großteil der zahlreichen plastidären PPR-Proteine, deren Funktionsverlust in *Arabidopsis* Embryoletalität bedingt, tatsächlich für die Translation benötigte Faktoren sind, bleibt zu verifizieren. Doch die bisher charakterisierten Mais-Mutanten von Orthologen solcher Embryogenese-relevanten Proteine und die Erkenntnisse zur Funktion orthologer PPR-Proteine in Angiospermen befürworten die hier vorgestellte These (siehe Abb. 37). Weitere experimentelle Belege erfordern die Analyse keimungsfähiger Mutanten für z. B. *Atppr5*, *Atppr2* oder *Atppr51*. Dabei könnte es ein erfolgversprechender Ansatz sein, das Problem der fehlenden Translation von *accD*, *ycf1* und *ycf2* zu beheben, indem die drei essentiellen plastidären Gene, mit Sequenzen für plastidäre Importsignale, in das nukleäre Genom eingebracht werden, beispielsweise über Transformationen von *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens*. Durch Kreuzung der gewonnenen Transformanten mit heterozygoten PPR-Mutanten und Selbstung der Nachkommen könnte es möglich sein, trotz eines *knockouts* von *Atppr5*, *Atppr2* bzw. *Atppr51* schließlich reinerbige, zur Keimung befähigte PPR-Mutanten zu isolieren. Deren Analyse würde zeigen, welche Funktion das entsprechende PPR-Protein in *Arabidopsis* ausübt. Mit der Generation unterschiedlicher Transformanten wäre zu untersuchen, die fehlende Translation welches der Gene *accD*, *ycf1* und *ycf2* komplementiert werden muss oder ob alle drei für die Embryogenese notwendig sind.

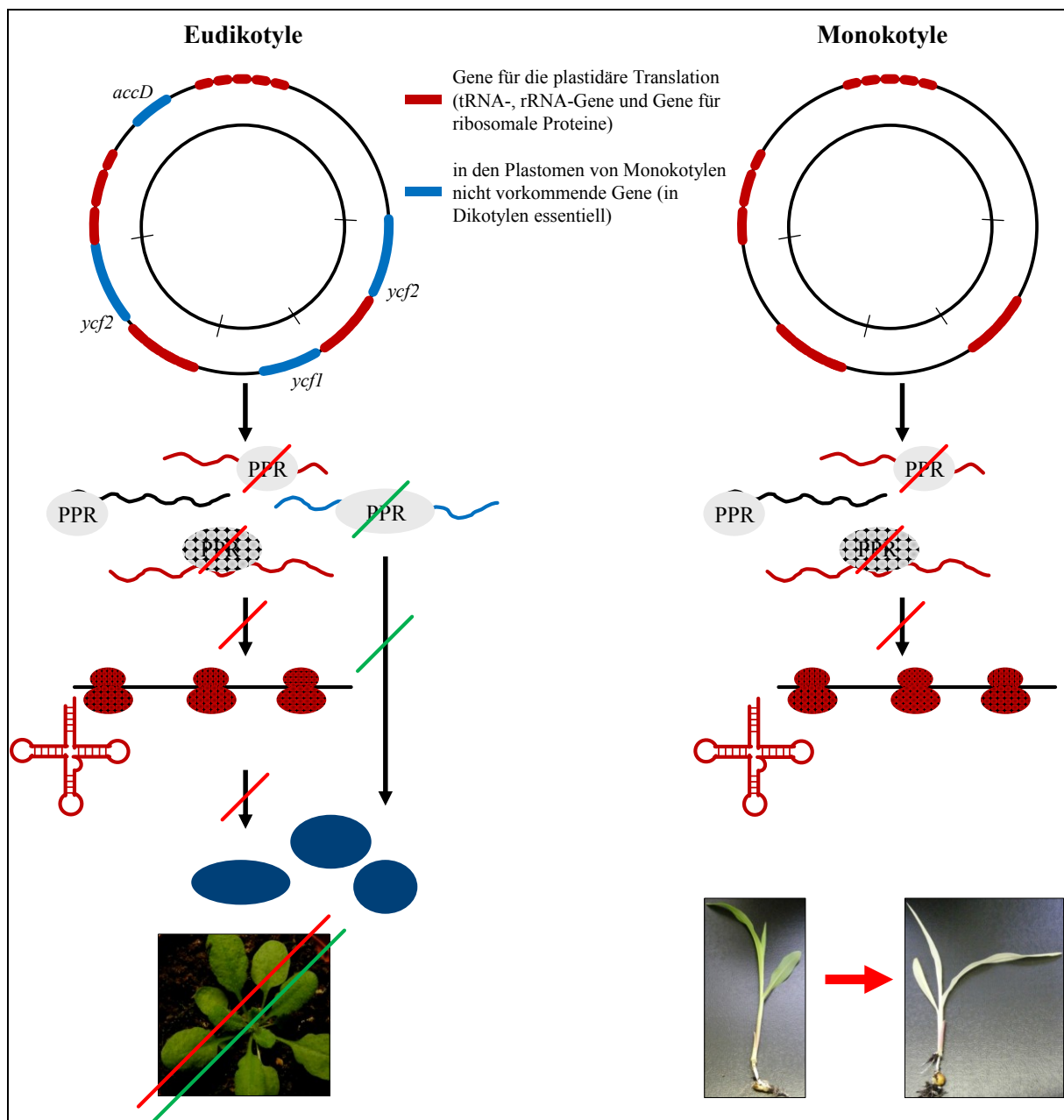


Abb. 37: Der unterschiedliche Einfluss von PPR-Gen-KOs: die Rolle von PPR-Proteinen in der plastidären Translation und Kodierungspotentiale der Plastome in Mono- und Eudikotylen

Oben sind schematisch die plastidären Genome von Eudikotylen und Monokotylen gezeigt. Rote Kästchen symbolisieren Gene, die Elemente der plastidären Translation kodieren, und blaue die drei Gene *accD*, *ycf1* und *ycf2*. Letztere werden von den Plastomen aller bekannten Eudikotylen kodiert, nicht jedoch von denen der Monokotylen. Durch einen KO eines PPR-Proteins, welches die Reifung oder Stabilität für die Translation essentieller RNA bedingt, werden plastidäre Transkripte nicht translatiert (rot durchgestrichene Pfeile). Monokotyle Pflanzen sind deshalb bleich. Eudikotyle dagegen können nicht keimen. Gleiches sollte gelten, wenn in Eudikotylen PPR-Proteine fehlen, die für den Metabolismus der *accD*-, *ycf1*- oder *ycf2*-Transkripte essentiell sind (grün durchgestrichen).

4.3.2 Die Rolle von PPR50 in Mais und *Arabidopsis*

Mit PPR50 wurde ein weiteres PPR-Protein im Rahmen der vorliegenden Arbeit studiert. Die isolierten *ppr50*-Mais-Mutanten sind albinotisch bzw. albeszent und die Analyse von Proteinen der Photosynthesekomplexe ließ aufgrund einer generellen reduzierten Proteinakkumulation auf einen plastidären Translationsdefekt in den Mais-Mutanten schließen (Abb. 26A und B, Abb. 27). In *Arabidopsis* jedoch sind homozygote Mutanten einer *Atppr50*-T-DNA-Insertionslinie keimungsfähig und ihr Phänotyp ist unauffällig (Abb. 23). Muss von einer der zuvor genannten Thesen Abstand genommen werden, d. h., ist die Funktion von PPR50 in *Arabidopsis* und Mais nicht konserviert oder beeinträchtigt ein Verlust der plastidären Translationsaktivität in diesem Fall nicht die Embryogenese in *Arabidopsis*?

Die analysierte Mutantenlinie in *Arabidopsis* weist eine T-DNA im 3'-Bereich des Gens *Atppr50*, im vorletzten von elf PPR-Motiven, auf. Es wäre also denkbar, dass es in den Mutanten zur Expression eines verkürzten PPR-Proteins kommt, das zumindest partiell funktionsfähig ist. Die Details zur Bindungsaktivität der PPR-Proteine und der Realisierung der Interaktion zwischen PPR-Protein und Ziel-RNA sind derzeit noch weitestgehend ungeklärt (siehe Abschnitt 1.2.3). Zwar wird gemäß den Analysen von Tavares-Carreón *et al.* jedes von sieben PPR-Motiven für die Funktionalität des Proteins PET309 benötigt, einer bioinformatischen Analyse mit TPRpred zufolge wurden jedoch nur die ersten sieben von insgesamt zwölf PPR-Motiven in diese Untersuchung einbezogen (Tavares-Carreón *et al.*, 2008; Karpenahalli *et al.*, 2007). Es ist also unklar, inwieweit die weiteren PPR-Motive für die Bindung der *cox1*-mRNA und deren Translation notwendig sind. Von drei Mutantenlinien mit Punktmutationen im PPR-Gen *pgr3* in *Arabidopsis* zeigten nur zwei einen *hcf*-Phänotyp (*high chlorophyll fluorescence*) sowie einen Defekt in der Akkumulation von *petL*-*petG*-Primärtranskripten. In Pflanzen, welche die Mutation im letzten von 27 PPR-Motiven aufwiesen, könnte zwar die Translationseffizienz von *petL* beeinträchtigt sein, doch ihr Transkriptmuster unterschied sich nicht von dem der Wildtypen (Yamazaki *et al.*, 2004). Einer Analyse mehrerer T-DNA-Insertionslinien durch Lurin *et al.* ist zu entnehmen, dass es für das DYW-PPR-Gen At1g20230 eine Mutantenlinie gibt, in der homozygote Mutanten einen verkümmerten Phänotyp mit später Blütenbildung aufweisen, während von einer zweiten T-DNA-Insertion im selben Gen keine homozygoten Mutanten gewonnen werden konnten, die Insertion demnach wahrscheinlich zu Embryoletalität führt (Lurin *et al.*, 2004). Beide in der vorliegenden Arbeit analysierten *Atppr51*-Mutantenlinien sind zwar mit Embryoletalität verknüpft, die im dritten Exon gelegene T-DNA-Insertion führt jedoch zu einem späteren

Zeitpunkt zum Abbruch der Embryogenese. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass, obwohl die unter 3.2.2 beschriebene Mutantenlinie *Atppr50-S04-4* keine phänotypischen Defekte erkennen lässt, eine Insertion im 5'-Bereich des Gens zu einem Funktionsverlust des Proteins AtPPR50 und einem phänotypischen Defekt, womöglich sogar zu einem Abbruch der Embryogenese führen könnte. Eine weitere T-DNA-Linie mit einer Insertion im letzten PPR-Motiv von *Atppr50* steht zur Verfügung, welche ebenfalls nicht von Wildtypen zu unterscheiden ist (Daten nicht gezeigt). Andere Mutantenlinien sind bisher nicht bekannt, was bedeuten könnte, dass der Selektionsdruck gegen eine solche Mutation sehr stark ist. Da kein spezifischer Antikörper gegen AtPPR50 gewonnen werden konnte, war es nicht möglich, experimentell die Existenz eines potentiellen verkürzten Proteins in den homozygoten Mutanten und damit die Validität der genannten Hypothese zu überprüfen.

Im Zusammenhang mit der *in silico*-Lokalisationsanalyse von PPR50 und seinen Orthologen in *Arabidopsis* und Reis bietet sich eine weitere Interpretation an. Während für PPR50 und OsPPR50 ein Import in die Plastiden vorausgesagt wird (Tab. 1), ist die Lokalisation des *Arabidopsis*-Proteins unsicher. Das kann selbstverständlich an einer zu berücksichtigenden Ungenauigkeit der genutzten Programme liegen, es kann jedoch ebenso ein Hinweis darauf sein, dass AtPPR50 tatsächlich nicht in die Chloroplasten importiert wird. Die Ursache einer fehlenden Konservierung in diesem Fall könnten Unterschiede in der chloroplastidären Genexpression verschiedener Pflanzen sein. Es wird beispielsweise angenommen, dass das plastidäre *rps16*-Gen in *Arabidopsis*, anders als in Mais, ein Pseudogen ist (I. Small, persönliche Mitteilung). Dieser Funktionsverlust könnte, ähnlich wie es bei *Medicago truncatula* und *Populus alba* gezeigt wurde, durch eine duale Lokalisation eines Kern-kodierten mitochondrialen PRS16-Proteins kompensiert werden (Ueda *et al.*, 2008). Ein möglicherweise in Mais mit der chloroplastidären *rps16*-RNA interagierender Faktor hätte in einigen anderen Angiospermen-Spezies demzufolge keine Funktion mehr. Somit erscheint eine Rolle von PPR50 in *Zea mays* in der Prozessierung oder Stabilisierung eines Transkripts, welches in den Chloroplasten von *Arabidopsis* nicht funktionell ist, denkbar. Dieses Szenario könnte erklären, weshalb *ppr50*-Mutanten in *Zea mays*, nicht jedoch in *Arabidopsis thaliana* einen phänotypischen Defekt aufweisen.

Insgesamt gilt, dass alle vorgeschlagenen Hypothesen nur rein spekulativer Natur sein können und die Klärung dieser interessanten Beobachtung einer weiteren Charakterisierung der isolierten *ppr50*-Insertionslinien aus *Arabidopsis* und Mais bedarf.

4.3.3 Der *ndh*-Phänotyp von *ppr54*-Mutanten in Mais und *Arabidopsis*

PPR54 wird in *Arabidopsis thaliana* ebenso wie in Mais für das Spleißen von Transkripten des *ndhA*-Lokus benötigt. Interessanterweise unterscheiden sich auch in diesem Fall die PPR-Mutanten beider Arten phänotypisch. Doch es sind, anders als bei *ppr5*, *ppr2* und *ppr51*, die Mais-Keimlinge, die eine stärkere Beeinträchtigung durch den Defekt erkennen lassen (Abb. 32B und Daten von M. Tillich).

Mais gehört zu den C₄-Pflanzen, deren Kohlenstoff-Fixierung eine spezielle Anpassung an Lebensräume mit starker Sonneneinstrahlung darstellt. Denn bei Hitze müssen die Stomata der Blätter weitgehend geschlossen sein, um den Wasserverlust einzugrenzen. Damit geht eine verminderte Aufnahme von Kohlendioxid einher, der CO₂-Partialdruck im Blatt sinkt, sodass die CO₂-Affinität der RuBisCo für eine effiziente Kohlenstoff-Fixierung nicht ausreicht. C₄-Pflanzen weisen eine besondere Blattanatomie mit zwei an der Photosynthese beteiligten Zelltypen auf. Der Calvin-Zyklus findet nur in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen statt, die sich um die Leitbündel gruppieren. In den Mesophyllzellen wird durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase Kohlendioxid in eine C₄-Verbindung eingebaut, die in die Bündelscheidenzellen geleitet wird. Dort wird das CO₂ abgespalten, somit ein ausreichend hoher CO₂-Partialdruck generiert und das CO₂ kann in den Calvin-Zyklus eingehen. Die Photosynthese wird so gegenüber der Photorespiration deutlich begünstigt. Das hat jedoch einen höheren Bedarf an ATP und Reduktionsäquivalenten im Vergleich zum C₃-Weg zur Folge (Übersichten in Edwards *et al.*, 2001a; Majeran und van Wijk, 2009), was den chloroplastidären Metabolismus von Mais in entscheidender Weise von dem der C₃-Pflanze *Arabidopsis thaliana* unterscheidet. In Anbetracht dessen sollten sich Defekte in der Akkumulation des NDH-Komplexes und damit eine reduzierte Verfügbarkeit von ATP tatsächlich gravierend, stärker als es bei *Arabidopsis* zu erwarten wäre, auf die Fitness von Mais-Pflanzen und ihre Befähigung zu einer effizienten Photosynthese auswirken. Genau diese physiologischen Unterschiede spiegeln die Phänotypen der *ppr54*-Mutanten in Mais und *Arabidopsis* wider. Somit sind die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutanten nicht nur im Zusammenhang mit der Analyse der Evolution und Funktion von PPR-Proteinen interessant, sondern diese Insertionslinie bietet sich darüber hinaus als erste bekannte *ndh*-Mutantenlinie mit C₄-Metabolismus für weitergehende physiologische Studien der Photosynthese und des Elektronentransports in C₄-Pflanzen an.

4.4 Was kann die Phylogenie von PPR-Proteinen über ihre Funktionen offenbaren?

Die sicherlich spektakulärste Besonderheit der PPR-Familie betrifft die außerordentliche Abundanz ihrer Mitglieder in höheren Pflanzen. Insofern wird es nicht erstrebenswert sein, von der Vielzahl der PPR-Proteine, die vermutlich alle eine wesentliche, nicht-redundante Funktion ausüben, jedes einzelne zu charakterisieren. Und es wird ebensowenig genügen, die Funktion ausgesuchter Proteine im Detail zu kennen, um ein generelles Verständnis dieser offenkundlich sehr diversen Familie zu erlangen. Deshalb stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, inwieweit die Verwandtschaftsverhältnisse von PPR-Proteinen Rückschlüsse auf ihre Funktionen und auf ihre RNA-Ziele zulassen könnten. Denn können Zusammenhänge zwischen der Phylogenie und Funktion von PPR-Proteinen bestimmt werden, würde das auf der einen Seite eine gewisse Möglichkeit zur Vorhersage der Interaktionspartner und Rolle noch unbekannter Proteine einräumen und auf der anderen Seite würde dies zum Verständnis der Evolution der Familie in Angiospermen beitragen. So wurden die nächsten Verwandten von PPR5 in Mais, dessen Funktion sehr genau ermittelt werden konnte, identifiziert (Abb. 19 bis 22), um zu prüfen, ob konservierte Funktionen oder Ziel-Transkripte innerhalb dieser kleinen Verwandtschaftsgruppe erkennbar sind. Von einem der nächsten Verwandten von PPR5, von PPR2, standen Mutanten bereits zur Verfügung (Williams und Barkan, 2003). Sie wurden in dieser Arbeit durch Northern-Analysen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass in den *ppr2*-Mutanten die Akkumulation der tRNA-Valin und der tRNA-Isoleucin reduziert ist. Die Analyse im Dunkeln gezogener Keimlinge ermöglichte dabei die Detektion von Transkripten, deren Abundanz bei unter Standardbedingungen kultivierten Albinos unter der Nachweisgrenze lag (Abb. 28). Diese Experimente reduzierten in den pflanzlichen Zellen den Stress durch reaktive Sauerstoff-Spezies und offenbarten damit eine für die Analyse von albinotischen Mutanten unter Umständen sehr hilfreiche Methode. Die Gene für die beiden in *ppr2*-Mutanten reduziert vorliegenden tRNAs enthalten jeweils ein Intron, wie es auch für die tRNA-Glycin (UCC) gilt, deren ungespleißter Vorläufer von PPR5 stabilisiert werden muss. So drängte sich die Hypothese auf, dass eine Gemeinsamkeit in dieser kleinen Protein-Gruppe eine Rolle im RNA-Metabolismus einer zu spleißenden tRNA sein könnte. Es wurden Mais-Mutanten für die Gene *ppr50* und *ppr51* isoliert (Abb. 25 und 26). Die Charakterisierung des Transkript-musters aller plastidären tRNAs, die ein Intron enthalten, zeigte jedoch keine spezifischen Defekte in diesen Mutanten (Abb. 29 und 30), sodass die Hypothese zu verwerfen ist.

Dennoch sind Gemeinsamkeiten, die die vier Proteine teilen, erkennbar. Es handelt sich bei den nächsten Verwandten von PPR5 ebenfalls um plastidär lokalisierte Proteine (*in silico*-Analysen, Tab. 1), welche auch einen Translationsdefekt zeigen, erkennbar an einer reduzierten Akkumulation von Untereinheiten aller photosynthetischen Proteinkomplexe sowie der klassisch albinotischen Pigmentierung der Nullmutanten (Abb. 27 und 26). Die Isolation der *ppr50*- und *ppr51*-Mutantenlinien bietet zukünftig die Möglichkeit, den spezifischen Defekt im plastidären RNA-Metabolismus dieser Mutanten, welcher dem gezeigten Translationsdefizit zugrunde liegt, im Detail zu ermitteln. Als RNA-Ziele von PPR50 und PPR51 kommen insbesondere Transkripte anderer tRNA-Gene, ribosomale RNAs oder mRNAs ribosomaler Proteine in Frage, deren Akkumulation in den Mutanten zu untersuchen sein wird. Den Mutantenanalysen vorangehende RIP-Chip-Experimente wären dabei sinnvoll, um zunächst gezielt die RNA-Liganden von PPR50 und PPR51 zu bestimmen. Versuche, gegen diese PPR-Proteine spezifische Antikörper zu entwickeln, scheiterten jedoch. Eine mögliche Alternative könnte die Immunopräzipitation Epitop-markierter, in Protoplasten transient exprimierter Proteine sein. Gelingt die Expression der mit einem Epitop fusionierten offenen Leserahmen von *ppr50* bzw. *ppr51*, können die Proteine mit einem Epitop-spezifischen Antikörper präzipitiert und die kopräzipitierten Transkripte mittels Chip-Analyse bestimmt werden. Auch die Charakterisierung der *ppr2*-Mutanten könnte in Zukunft durch entsprechende RIP-Chip-Analysen ergänzt werden. Um die Aussagekraft der Methode zu testen, sollte sie zuerst für ein Protein, dessen *in vivo*-Ligand bekannt ist, erprobt werden. Dafür würde sich PPR5 anbieten. Weiterführende Untersuchungen von PPR2, PPR50 und PPR51 könnten Bindestudien mit rekombinant exprimierten Proteinen einschließen. *Gel mobility shift*-Analysen wären geeignet, die PPR-Bindestellen *in vitro* genau zu kartieren und so möglicherweise Sequenzmotive zu identifizieren, die für die Interaktion dieser PPR-Proteine mit ihren RNA-Zielen entscheidend sind.

Es wird darüber hinaus interessant sein, welche Funktionen die Proteine PPR2, PPR50 und PPR51 ausüben, d. h., ob die nächsten Verwandten von PPR5 ebenfalls die Stabilität eines Transkripts gewährleisten. Diese Charakterisierungen werden zeigen, ob in der gewählten Verwandtschaftsgruppe Ähnlichkeiten in den Funktionen oder RNA-Liganden der Proteine zu bestimmen sind, welche Schlussfolgerungen zur Evolution der P-Typ-PPR-Proteine innerhalb der Angiospermen zulassen könnten. Insbesondere Erkenntnisse zur Evolution der Spezifität für definierte Transkripte werden in Zukunft das Verständnis dieser ungewöhnlichen Proteinfamilie voranbringen.

Literaturverzeichnis

- Abdallah, F., Salamini, F. und Leister, D. (2000). A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 5: 141-142.
- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K. und Fujimura, T. (2004). Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria targeting PPR protein. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1449-1457.
- Allison, L. A., Simon, L. D. und Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* 15: 2802-2809.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. und Aravind, L. (2002). Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* 30: 1427-1464.
- Andrés, C., Lurin, C. und Small, I. (2007). The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiol. Plant.* 129: 14-22.
- Ankele, E., Heberle-Bors, E., Pfosser, M. F. und Hofinger, B. J. (2005). Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 651-664.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Asakura, Y. und Barkan, A. (2006). *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol.* 142: 1656-1663.

- Asakura, Y. und Barkan, A. (2007). A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell* 19: 3864-3875.
- Aubourg, S., Boudet, N., Kreis, M. und Lecharny, A. (2000). In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol. Biol.* 42: 603-613.
- Barkan, A. (1988). Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *EMBO J.* 7: 2637-2644.
- Barkan A (1993). Nuclear mutants of maize with defects in chloroplast polysome assembly have altered chloroplast RNA metabolism. *Plant Cell* 5: 389-402.
- Barkan, A. (1998). Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants. *Methods Enzymol.* 297: 38-57.
- Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M. (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* 82: 559-572.
- Barkan, A., Miles, D. und Taylor, W. C. (1986). Chloroplast gene expression in nuclear, photosynthetic mutants of maize. *EMBO J.* 5:1421-1427.
- Barkan, A., Voelker, R., Mendel-Hartvig, J., Johnson, D. und Walker, M. (1995). Genetic analysis of chloroplast biogenesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 93: 163-170.
- Bauer, J., Hiltbrunner, A. und Kessler, F. (2001). Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 420-433.
- Beick, S., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Jensen, B. und Barkan, A. (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5337-5347.
- Bensing, B. A., Meyer, B. J. und Dunny, G. M. (1996). Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7794-7799.
- Bentolila, S., Alfonso, A. A. und Hanson, M. R. (2002). A pentatricopeptide repeat containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10887-10892.
- Berg, M., Rogers, R., Muralla, R. und Meinke, D. (2005). Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 866-878.

- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62: 293-300.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Blatch, G. L. und Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21: 932-939.
- Bock, R. (2007). Structure, function, and inheritance of plastid genomes. In: Cell and molecular biology of plastids. Hrsg. R. Bock, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 29-64.
- Bollenbach, T. J., Schuster, G., Portnoy, V. und Stern, D. (2007). Processing, degradation, and polyadenylation of chloroplast transcripts. In: Cell and molecular biology of plastids. Hrsg. R. Bock, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 175-211.
- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M. und Rochaix, J. D. (1997). The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I complex. *EMBO J.* 16: 6095-6104.
- Bowers, J. E., Chapman, B. A., Rong, J. und Paterson, A. H. (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422: 433-438.
- Brown, G. G., Formanova, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W. Y. und Landry, B. S. (2003). The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 35: 262-272.
- Chang, C. C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S. und Stern, D. B. (1999). Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* 11: 911-926.
- Chase, C. D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends Genet.* 23: 81-90.
- Chateigner-Boutin, A. L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A., Andrés, C., de la Luz Gutierrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., Jiménez, L. F., Lurin, C., Small, I. und León, P. (2008). CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J.* 56: 590-602.
- Chaw, S. M., Chang, C. C., Chen, H. L., Li, W. H. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J. Mol. Evol.* 58: 424-441.

- Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
- Coffin, J. W., Dhillon, R., Ritzel, R. G. und Nargang, F. E. (1997). The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. *Curr. Genet.* 32: 273-280.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890.
- Cushing, D. A., Forsthoefel, N. R., Gestaut, D. R. und Vernon, D. M. (2005). *Arabidopsis emb175* and other *ppr* knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta* 221: 424-436.
- D'Andrea, L. D. und Regan, L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* 28: 655-662.
- Davidov, Y. und Jurkevitch, E. (2009). Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes. *Bioessays* 31: 748-757.
- Davies, S. M. K., Rackham, O., Shearwood, A. M. J., Hamilton, K. L., Narsai, R., Whelan, J. und Filipovska, A. (2009). Pentatricopeptide repeat domain protein 3 associates with the mitochondrial small ribosomal subunit and regulates translation. *FEBS Letters* 583: 1853-1858.
- Delannoy, E., Stanley, W. A., Bond, C. S. und Small, I. (2007). Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 1643-1647
- De Las Rivas, J., Lozano, J. J. und Ortiz, A. R. (2002). Comparative analysis of chloroplast genomes: functional annotation, genome-based phylogeny, and deduced evolutionary patterns. *Genome Res.* 12: 567-583.
- del Campo, E. M. (2009). Post-transcriptional control of chloroplast gene expression. *Gene Regul. Syst. Bio.* 3: 31-47.
- del Campo, E. M., Sabater, B. und Martin, M. (2000). Transcripts of the *ndhH-D* operon of barley plastids: possible role of unedited site III in splicing of the *ndhA* intron. *Nucleic Acids Res.* 1: 1092-1098.
- Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R. und Bendahmane, A. (2003). Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptide repeat protein family. *EMBO Rep.* 4: 588-594.

- Deusch, O., Landan, G., Roettger, M., Gruenheit, N., Kowallik, K. V., Allen, F. A., Martin, W. und Dagan, T. (2008). Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor. *Mol. Biol. Evol.* 25: 748-761.
- Deutscher, M. P. (2003). Degradation of stable RNA in bacteria. *J. Biol. Chem.* 278: 45041-45044.
- Diekmann, K., Hodkinson, T. R., Wolfe, K. H., van den Bekerom, R., Dix, P. J. und Barth, S. (2009). Complete chloroplast genome sequence of a major allogamous forage species, perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *DNA Res.* 16: 165-176.
- Ding, Y. H., Liu, N. Y., Tang, Z. S., Liu, J. und Yang, W. C. (2006) *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* 18: 815-830.
- Dolezal, P., Smid, O., Rada, P., Zubacova, Z., Bursac, D., Sutak, R., Nebesarova, J., Lithgow, T. und Tachezy, J. (2005). Giardia mitosomes and trichomonad hydro-genosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 10924-10929.
- Doniwa, Y., Ueda, M., Ueta, M., Wada, A., Kadowaki, K. I. und Tsutsumi, N. (2010). The involvement of a PPR protein of the P subfamily in partial RNA editing of an *Arabidopsis* mitochondrial transcript. *Gene* 454: 39-46.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Carrer, H. und Bock, R. (2000). The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J.* 22: 97-104.
- Edwards, G. E., Franceschi, V. R., Ku, M. S. B., Voznesenskaya, E. V., Pyankov, V. I. und Andreo, C. S. (2001a). Compartmentation of photosynthesis in cells and tissues of C₄ plants. *J. Exp. Bot.* 52: 577-590.
- Edwards, T. A., Pyle, S. E., Wharton, R. P. und Aggarwal, A. K. (2001b). Structure of pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. *Cell* 105: 281-289.
- Emanuel, C., Weihe, A., Graner, A., Hess, W. R., und Börner, T. (2004). Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J.* 38: 460-472.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., und von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300: 1005-1016.

- Embley, T. M. und Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623-630
- Falcon de Longevialle, A., Hendrickson, L., Taylor, N. L., Delannoy, E., Lurin, C., Badger, M., Millar, A. H. und Small, I. (2008). The pentatricopeptide repeat gene *otp51* with two LAGLIDADG motifs is required for the *cis*-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56: 157-168.
- Falcon de Longevialle, A., Meyer, E. H., Andrés, C., Taylor, N. L., Lurin, C., Millar, A. H. und Small, I. (2007). The pentatricopeptide repeat gene *otp43* is required for *trans*-splicing of the mitochondrial *nad1* intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19: 3256-3265.
- Ferat, J. L. und Michel, F. (1993). Group II self-splicing introns in bacteria. *Nature* 364: 358-361.
- Fisk, D. G., Walker, M. B. und Barkan, A. (1999). Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* 18: 2621-2630.
- Fitch, W. M. (1970). Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst. Zool.* 19: 99-106.
- Funk, H. T., Berg, S., Krupinska, K., Maier, U. G. und Krause, K. (2007). Complete DNA sequences of the plastid genomes of two parasitic flowering plant species, *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta gronovii*. *BMC Plant Biol.* 7: 45-56.
- Geddy, R. und Brown, G. G. (2007). Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. *BMC Genomics* 8: 130-142.
- Gillman, J. D., Bentolila, S. und Hanson, M. R. (2007). The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. *Plant J.* 49: 217-227.
- Gould, S. B., Waller, R. F. und McFadden, G. I. (2008). Plastid evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 491-517.
- Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol.* 2: 1018.1-1018.5.
- Gray, M. W. und Lang, B. F. (1998). Transcription in chloroplasts and mitochondria: A tale of two polymerases. *Trends Microbiol.* 6: 1-3.

- Hammani, K., Okuda, K., Tanz, S. K., Chateigner-Boutin, A. L., Shikanai, T. und Small, I. (2009). A study of new *Arabidopsis* chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *Plant Cell* 21: 3686-3699.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hashimoto, M., Endo, T., Peltier, G., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2003). A nucleus-encoded factor, CRR2, is essential for the expression of chloroplast *ndhB* in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36: 541-549.
- Hattori, M., Miyake, H. und Sugita, M. (2007). A pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of *clpP* pre-mRNA in moss chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 282: 10773-10782.
- Hedtke, B., Börner, T. und Weihe, A. (1997). Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277: 809-811.
- Hedtke, B., Börner, T. und Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* 1: 435-440.
- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R. G. und Börner, T. (2002). Six active phagetype RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 30, 625-637.
- Hedtke, B., Meixner, M., Gillandt, S., Richter, E., Börner, T. und Weihe, A. (1999). Green fluorescent protein as a marker to investigate targeting of organellar RNA polymerases of higher plants *in vivo*. *Plant J.* 17: 557-561.
- Hess, W. R. und Börner, T. (1999). Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 190: 1-59.
- Hess, W. R., Hübschmann, T. und Börner, T. (1994). Ribosome-deficient plastids of *albostrians* barley: Extreme representatives of nonphotosynthetic plastids. *Endocytobiosis & Cell Res.* 10: 65-80.
- Hess, W. R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. R. und Börner, T. (1993). Chloroplast *rps15* and the *rpoB-C1-C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: Evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.* 12: 563-571.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C. R., Meng, B. Y., Li, Y. Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Sjompuaki, K. und Sugiura, M. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Inermolecular recombination between distict tRNA genes

- accounts for a major plastid DNA in version during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194.
- Ikeda, T. M. und Gray, M. W. (1999). Identification and characterization of T3/T7 bacteriophage-like RNA polymerase sequences in wheat. *Plant Mol. Biol.* 40: 567-578.
- Jenkins, B. D., Kulhanek, D. J. und Barkan, A. (1997). Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9: 283-296.
- Johnson, X., Wostrikoff, K., Finazzi, G., Kuras, R., Schwarz, C., Bujaldon, S., Nickelsen, J., Stern, D. B., Wollman, F. A. und Vallon, O. (2010). MRL1, a conserved pentatricopeptide repeat protein, is required for stabilization of *rbcL* mRNA in *Chlamydomonas* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 234-248.
- Karpenahalli, M. R., Lupas, A. N. und Söding, J. (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8: 2-9.
- Kato, H., Tezuka, K., Feng, Y. Y., Kawamoto, T., Takahashi, H., Mori, K. und Akagi, H. (2007). Structural diversity and evolution of the *Rf-1* locus in the genus *Oryza*. *Heredity* 99: 516-524.
- Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M. und Toriyama, K.. (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. *Plant J.* 55: 619-628.
- Kazama, T. und Toriyama, K. (2003). A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic malesterile rice. *FEBS Lett.* 544: 99-102.
- Keeling, P. J. und Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* 9: 605-618.
- Klein, D., Kern, R. M. und Sokol, R. Z. (1995). A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 59-66.
- Klein, R. R., Klein, P. E., Mullet, J. E., Minx, P., Rooney, W. L. und Schertz, K. F. (2005). Fertility restorer locus *Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.* 111: 994-1012.
- Kobayashi, Y., Dokiya, Y., Kumazawa, Y. und Sugita, M. (2002). Non-AUG translation initiation of mRNA encoding plastid-targeted phage-type RNA polymerase in *Nicotiana sylvestris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299: 57-61.

- Kobayashi, Y., Dokiya, Y. und Sugiura, M. (2001). Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 1106-1113.
- Kode, V., Mudd, E. A., Iamtham, S. und Day, A. (2005). The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J.* 44: 237-244.
- Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S. und Imamura, J. (2003). Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J.* 34: 407-415.
- Koonin, E. V. (2005). Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* 39: 309-338.
- Kotera, E., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* 433: 326-330.
- Koussevitzky, S., Nott, A., Mockler, T. C., Hong, F., Sachetto-Martins, G., Surpin, M., Lim, J., Mittler, R. und Chory, J. (2007). Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316: 715-719.
- Kowallik, K. V. (1994). From endosymbionts to chloroplasts: Evidence for a single prokaryotic/eukaryotic endocytobiosis. *Endocytobiosis & Cell Res.* 10: 137-149.
- Kühn, K., Weihe, A. und Börner, T. (2005). Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 33: 337-346.
- Kusumi, K., Yara, A., Mitsui, N., Tozawa, Y. und Iba, K. (2004). Characterization of a rice nuclear-encoded plastid RNA polymerase gene *OsRpoTp*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1194-1201.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lang, B. F., Gray, M. W. und Burger, G. (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33: 351-397.
- Legen, J., Wanner, G., Herrmann, R. G., Small, I. und Schmitz-Linneweber, C. (2007). Plastid tRNA genes *trnC-GCA* and *trnN-GUU* are essential for plant cell development. *Plant J.* 51: 751-762.
- Li, Y., Rosso, M. G., Strizhov, N., Viehoveer, P. und Weisshaar, B. (2003). GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 19: 1441-1442.

- Li, Y., Rosso, M. G., Strizhov, N., Viehoveer, P. und Weisshaar, B. (2007). GABI-Kat SimpleSearch: an *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions. *Nucleic Acids Res.* 35: 874-878.
- Li, Z., Reimers, S., Pandit, S. und Deutscher, M. P. (2002). RNA quality control: degradation of defective transfer RNA. *EMBO J.* 21: 1132-1138.
- Liere, K. und Börner, T. (2007). Transcription and transcriptional regulation in plastids. In: Cell and molecular biology of plastids. Hrsg. R. Bock, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 121-174.
- Liere, K., Kaden, D., Maliga, P. und Börner, T. (2004). Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res.* 32: 1159-1165.
- Loiselay, C., Gumpel, N. J., Girard-Bascou, J., Watson, A. T., Purton, S., Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2008). Molecular identification and function of *cis*- and *trans*-acting determinants for *petA* transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5529-5542.
- Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M. L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J. P., Szurek, B., Taconnat, L. und Small, I. (2004). Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L. und Kössel, H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* 251: 614-628.
- Maier, U. G., Bozarth, A., Funk, H. T., Zauner, S., Rensing, S. A., Schmitz-Linneweber, C., Börner, T. und Tillich, M. (2008). Complex chloroplast RNA metabolism: Just debugging the genetic programme? *BMC Biol.* 6: 36-44.
- Majeran, W. und van Wijk, K. J. (2009). Cell-type-specific differentiation of chloroplasts in C4 plants. *Trends Plant Sci.* 14: 100-109.
- Mancebo, R., Zhou, X., Shillinglaw, W., Henzel, W. und Macdonald, P. (2001). BSF binds specifically to the *bicoid* mRNA 3' untranslated region and contributes to stabilization of *bicoid* mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3462-3471.
- Manthey, G. M. und McEwen, J. E. (1995). The product of the nuclear gene *pet309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs

- derived from the mitochondrial *cox1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4031-4043.
- Martin, W. und Herrmann, R. G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol.* 118: 9-17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. und Penny, D. (2002). Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12246-12251.
- McFadden, G. I. (2001). Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol.* 125: 50-53.
- McFadden, G. I. und van Dooren, G. G. (2004). Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol.* 14: 514-516.
- McNeal, J. R., Kuehl, J. V., Boore, J. L. und de Pamphilis, C. W. (2007). Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC Plant Biology* 7: 57-78.
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. und Schuster, G. (2003). HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell* 15:1480-1495.
- Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* 25: 593-604.
- Michel, F. und Ferat, J. L. (1995). Structure and activities of group II introns. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 435-461.
- Michel, F., Umesono, K. und Ozeki, H. (1989). Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns - a review. *Gene* 82: 5-30.
- Morden, C. W., Wolfe, K. H., de Pamphilis, C. W. und Palmer, J. D. (1991). Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: intact, missing and pseudogenes. *EMBO J.* 10: 3281-3288.
- Mudd, E. A., Sullivan, S., Gisby, M. F., Mironov, A., Kwon, C. S., Chung, W. I. und Day, A. (2008). A 125 kDa RNase E/G-like protein is present in plastids and is essential for chloroplast development and autotrophic growth in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 59: 2597-2610.
- Mullet, J. E. und Klein, R. R. (1987). Transcription and RNA stability are important determinants of higher plant chloroplast RNA levels. *EMBO J.* 6: 1571-1579.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

- Nakamura, T., Meierhoff, K., Westhoff, P. und Schuster, G. (2003). RNA binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur. J. Biochem.* 270: 4070-4078.
- Nakamura, T. und Sugita, M. (2008). A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endoribonuclease activity. *FEBS Lett.* 582: 4163-4168.
- Nickelsen, J. (2003a). Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr. Genet.* 43: 392-399.
- Nickelsen, J. (2003b). Molecular genetics of chloroplast biogenesis. *Prog. Botany* 64: 53-73.
- Okuda, K., Chateigner-Boutin, A. L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. und Shikanai, T. (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Cell* 21: 146-156.
- Okuda, K., Hammani, K., Tanz, S. K., Peng, L., Fukao, Y., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. und Shikanai, T. (2010). The pentatricopeptide repeat protein OTP82 is required for RNA editing of plastid *ndhB* and *ndhG* transcripts. *Plant J.* 61: 339-349.
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. und Shikanai, T. (2007). Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 8178-8183.
- Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T. und Shikanai, T. (2006). A pentatricopeptide repeat protein is a site-recognition factor in chloroplast RNA editing. *J. Biol. Chem.* 281: 37661-37667.
- Ostersetzer, O., Cooke, A. M., Watkins, K. P. und Barkan, A. (2005). CRS1, a chloroplast group II intron splicing factor, promotes intron folding through specific interactions with two intron domains. *Plant Cell* 17: 241-255.
- Ostheimer, G. J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J. und Barkan, A. (2003). Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *EMBO J.* 22: 3919-3929.
- O'Toole, N., Hattori, M., Andrés, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., Sugita, M. und Small, I. (2008). On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1120-1128.
- Page, R. D. M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

- Pfalz, J., Bayraktar, O. A., Prikryl, J. und Barkan, A. (2009). Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *EMBO J.* 28: 2042-2052.
- Pusnik, M., Small, I., Read, L. K., Fabbro, T. und Schneider, A. (2007). Pentatricopeptide repeat proteins in *Trypanosoma brucei* function in mitochondrial ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* 27: 6876-6888.
- Pyke, K. (2007). Plastid biogenesis and differentiation. In: Cell and molecular biology of plastids. Hrsg. R. Bock, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 1-28.
- Raven, J. A. und Allen, J. F. (2003). Genomics and chloroplast evolution: What did cyanobacteria do for plants? *Gen. Biol.* 4: 209.1-209.5.
- Raynaud, C., Loisel, C., Wostrikoff, K., Kuras, R., Girard-Bascou, J., Wollman, F. A. und Choquet, Y. (2007). Evidence for regulatory function of nucleus-encoded factors on mRNA stabilization and translation in the chloroplast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9093-9098.
- Richly, E. und Leister, D. (2004). An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* 329: 11-16.
- Rivals, E., Bruyere, C., Toffano-Nioche, C. und Lecharny, A. (2006). Formation of the *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat family. *Plant Physiol.* 141: 825-839.
- Robbins, J. C., Heller, W. P. und Hanson, M. R. (2009). A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the *Arabidopsis* chloroplast *accD* transcript. *RNA* 15: 1142-1153.
- Rogalski, M., Karcher, D. und Bock, R. (2008). Superwobbling facilitates translation with reduced tRNA sets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15: 192-198.
- Rogalski, M., Ruf, S. und Bock, R. (2006). Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Res.* 34: 4537-4545.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* 53: 247-259.
- Rüdinger, M., Polsakiewicz, M. und Knoop, V. (2008). Organellar RNA editing and plant-specific extensions of pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in jungermanniid but not in marchantiid liverworts. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1405-1414.

- Ruppel, N. J. und Hangarter, R. P. (2007). Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 7: 37-46.
- Saitou, N. und M. Nei. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saldanha, R., Mohr, G., Belfort, M. und Lambowitz, A. M. (1993). Group I and group II introns. *FASEB J.* 7: 15-24.
- Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V. und Lurin, C. (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Lett.* 581: 4132-4138.
- Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, Vol. 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sane, A. P., Stein, B. und Westhoff, P. (2005). The nuclear gene *HCF107* encodes a membrane-associated R-TPR (RNA tetratricopeptide repeat)-containing protein involved in expression of the plastidial *psbH* gene in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42: 720-730.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K. und Kabeya, Y. (2003). Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int. Rev. Cytol.* 232: 217-262.
- Schein, A., Sheffy-Levin, S., Glaser, F. und Schuster, G. (2008). The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the *E. coli* enzyme. *RNA* 14: 1057-1068.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A. (2007). RNA splicing and RNA editing in chloroplasts. In: Cell and molecular biology of plastids. Hrsg. R. Bock, Springer Verlag Berlin Heidelberg. 213-248.
- Schmitz-Linneweber, C., Kushnir, S., Babiychuk, E., Poltnigg, P., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2005a). Pigment deficiency in nightshade/tobacco hybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase alpha-subunit mRNA. *Plant Cell* 17: 1815-1828.
- Schmitz-Linneweber, C., Regel, R., Du, T. G., Hupfer, H., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2002). The plastid chromosome of *Atropa belladonna* and its comparison with that of *Nicotiana tabacum*: the role of RNA editing in generating divergence in the process of plant speciation. *Mol. Biol. Evol.* 19: 1602-1612.
- Schmitz-Linneweber, C. und Small, I. (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* 13: 663-670.

- Schmitz-Linneweber, C., Tillich, M., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2001). Heterologous, splicing-dependent RNA editing in chloroplasts: allotetraploidy provides *trans*-factors. *EMBO J.* 20: 4874-4883.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2005b). RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17: 2791-2804.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Williams-Voelker, P. M., Kroeger, T. S., Vichas, A. und Barkan, A. (2006). A pentatricopeptide repeat protein facilitates the *trans*-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell* 18: 2650-2663.
- Schnable, P. S. und Wise, R. P. (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci.* 3:175-180.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. und Goff, S. A. (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell.* 14: 2985-2994.
- Small, I. und Peeters, N. (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25: 46-47.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F. und Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581-1590.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stern, D. B., Hanson, M. R. und Barkan, A. (2004). Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system. *Trends Plant Sci.* 9: 293-301.
- Stewart, C. N. und Via, L. E. (1993). A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14: 748-749.
- Sugiura, M., Hirose, T. und Sugita, M. (1998). Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 32: 437-459.
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K. und Börner, T. (2007). High diversity of plastidial promoters in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 277: 725-734.
- Takenaka, M. (2010). MEF9, an E subclass PPR protein, is required for an RNA editing event in the *nad7* transcript in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 152: 939-947.

- Tasaki, E., Hattori, M. und Sugita, M. (2010). The moss pentatricopeptide repeat protein with a DYW domain is responsible for RNA editing of mitochondrial *ccmFc* transcript. *Plant J.* 62: 560-570.
- Tavares-Carreón, F., Camacho-Villasana, Y., Zamudio-Ochoa, A., Shingu-Vazquez, M., Torres-Larios, A. und Perez-Martinez, X. (2008). The pentatricopeptide repeats present in PET309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *coxI* mRNA in yeast. *J. Biol. Chem.* 283: 1472-1479.
- Thompson, J., Higgins, D. und Gibson, T. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tian, C. G., Xiong, Y. Q., Liu, T. Y., Sun, S. H., Chen, L. B. und Chen, M. S. (2005). Evidence for an ancient whole-genome duplication event in rice and other cereals. *Yi Chuan Xue Bao* 32: 519-527.
- Till B., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA* 7: 1227-1238.
- Tillich, M., Funk, H. T., Schmitz-Linneweber, C., Poltnigg, P., Sabater, B., Martin, M. und Maier, R. M. (2005). Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J.* 43: 708-715.
- Tillich, M., Hardel, S. L., Kupsch, C., Armbruster, U., Delannoy, E., Lehwark, P., Leister, D., Small, I. und Schmitz-Linneweber, C. (2009). Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 6002-6007.
- Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B. R. und Maier, U. G. (2006a). The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1912-1921.
- Tillich, M., Poltnigg, P., Kushnir, S. und Schmitz-Linneweber, C. (2006b). Maintenance of plastid RNA editing activities independently of their target sites *EMBO Rep.* 7: 308-313.
- Tillich, M., Schmitz-Linneweber, C., Herrmann, R. G. und Maier, R. M. (2001). The plastid chromosome of maize (*Zea mays*): update of the complete sequence and transcript editing sites. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 75: 42-44.
- Tzafrir, I., Dickerman, A., Brazhnik, O., Nguyen, Q., McElver, J., Frye, C., Patton, D. und Meinke, D. (2003). The *Arabidopsis* SeedGenes Project. *Nucleic Acids Res.* 31: 90-93.

- Ueda, M., Nishikawa, T., Fujimoto, M., Takanashi, H., Arimura, S., Tsutsumi, N. und Kadowaki, K. (2008). Substitution of the gene for chloroplast RPS16 was assisted by generation of a dual targeting signal. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1566-1575.
- Uwer, U., Willmitzer, L. und Altmann, T. (1998). Inactivation of a glycyl-tRNA synthetase leads to an arrest in plant embryo development. *Plant Cell* 10: 1277-1294.
- Uyttewaal, M., Mireau, H., Rurek, M., Hammani, K., Arnal, N., Quadrado, M. und Giegé, P. (2008). PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.* 375: 626-636.
- Vellai, T., Takács, K. und Vida, G. (1997). A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J. Mol. Evol.* 46: 499-507.
- Verbitskiy, D., Zehrmann, A., van der Merwe, J. A., Brennicke, A. und Takenaka, M. (2010). The PPR-protein encoded by the LOVASTATIN INSENSITIVE 1 gene is involved in RNA editing at three sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 61: 446-455.
- Voelker, R. und Barkan, A. (1995). Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *EMBO J.* 14: 3905-3914.
- Vogel, J., Börner, T. und Hess, W. R. (1999). Comparative analysis of splicing of the complete set of chloroplast group II introns in three higher plant mutants. *Nucleic Acids Res.* 27: 3866-3874.
- Vogel, J. und Hess, W. R. (2001). Complete 5' and 3' end maturation of group II intron-containing tRNA precursors. *RNA* 7: 285-292.
- Vogel, J., Hübschmann, T., Börner, T. und Hess, W. R. (1997). Splicing and intron-internal RNA editing of *trnK-matK* transcripts in barley plastids: Support for MatK as an essential splice factor. *J. Mol. Biol.* 270: 179-187.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (2001). The genomics of land plant chloroplasts: gene content and alteration of genomic information by RNA editing. *Photosynth. Res.* 70: 107-118.
- Walbot, V. und Coe, E. H. J. (1979). Nuclear gene *iojap* conditions a programmed change to ribosome-less plastids in *Zea mays*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2760-2764.
- Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., Su, D., Chen, Y., Guo, J., Luo, D., Long, Y., Zhong, Y. und Liu, Y.G. (2006). Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 18: 676-687.

- Waters, M. T. und Langdale, J. A. (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J.* 28: 2861-2873.
- Watkins, K. P., Kroeger, T. S., Cooke, A. M., Williams-Carrier, R., Friso, G., Belcher, S. E., van Wijk, K. J. und Barkan, A. (2007). A ribonuclease III domain protein functions in group II intron splicing in maize chloroplasts. *Plant Cell* 19: 2606-2623.
- Wilkinson, M., Doskow, J. und Lindsey, S. (1991). RNA blots: staining procedures and optimization of conditions. *Nucleic Acids Res.* 19: 679.
- Williams, P. und Barkan, A. (2003). A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J.* 36: 675-686.
- Williams-Carrier, R., Kroeger, T. und Barkan, A. (2008). Sequence-specific binding of a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to its native group II intron ligand. *RNA* 14: 1930-1941.
- Wilson, C. G. M., Kajander, T. und Regan, L. (2005). The crystal structure of Nlpl. A prokaryotic tetratricopeptide repeat protein with a globular fold. *FEBS J.* 272: 166-179.
- Xu, X. B., Liu, Z. X., Zhang, D. F., Liu, Y., Song, W. B., Li, J. S. und Dai, J. R. (2009). Isolation and analysis of rice *Rfl*-orthologus PPR genes co-segregating with *Rf3* in maize. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 511-517.
- Yamazaki, H., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2004). PPR motifs of the nucleus-encoded factor, PGR3, function in the selective and distinct steps of chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 38: 152-163.
- Yokobori, S. und Pääbo, S. (1995). Transfer RNA editing in land snail mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10432-10435.
- Yu, J., Wang, J., Lin, W., Li, S., Li, H., Zhou, J., Ni, P., Dong, W., Hu, S., Zeng, C., Zhang, J., Zhang, Y., Li, R., Xu, Z., Li, S., Li, X., Zheng, H., Cong, L., Lin, L., Yin, J., Geng, J., Li, G., Shi, J., Liu, J., Lv, H., Li, J., Wang, J., Deng, Y., Ran, L., Shi, X., Wang, X., Wu, Q., Li, C., Ren, X., Wang, J., Wang, X., Li, D., Liu, D., Zhang, X., Ji, Z., Zhao, W., Sun, Y., Zhang, Z., Bao, J., Han, Y., Dong, L., Ji, J., Chen, P., Wu, S., Liu, J., Xiao, Y., Bu, D., Tan, J., Yang, L., Ye, C., Zhang, J., Xu, J., Zhou, Y., Yu, Y., Zhang, B., Zhuang, S., Wei, H., Liu, B., Lei, M., Yu, H., Li, Y., Xu, H., Wei, S., He, X., Fang, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Huang, X., Su, Z., Tong, W., Li, J., Tong, Z., Li, S., Ye, J., Wang, L., Fang, L., Lei, T., Chen, C., Chen, H., Xu, Z., Li, H., Huang, H., Zhang, F., Xu, H., Li, N., Zhao, C., Li, S., Dong, L., Huang, Y., Li, L., Xi, Y., Qi, Q., Li, W., Zhang, B., Hu, W., Zhang, Y., Tian, X., Jiao, Y., Liang, X., Jin, J., Gao, L., Zheng, W., Hao, B., Liu, S., Wang, W., Yuan, L., Cao, M., McDermott, J., Samudrala, R., Wang, J.,

- Wong, K. und Yang H. (2005). The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol.* 3: 266-281.
- Yu, Q. B., Jiang, Y., Chong, K., Yang, Z. N. (2009). AtECB2, a pentatricopeptide repeat protein, is required for chloroplast transcript *accD* RNA editing and early chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59: 1011-1023.
- Yuan, Y. W., Liu, C., Marx, H. E. und Olmstead, R. G. (2009). The pentatricopeptide repeat (PPR) gene family, a tremendous resource for plant phylogenetic studies. *New Phytol.* 182: 272-283.
- Zehrmann, A., Verbitskiy, D., van der Merwe, J. A., Brennicke, A. und Takenaka, M. (2009). A DYW domain containing pentatricopeptide repeat protein is required for RNA editing at multiple sites in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 558-567.
- Zhou, W., Cheng, Y., Yap, A., Chateigner-Boutin, A. L., Delannoy, E., Hammani, K., Small, I. und Huang, J. (2008). The *Arabidopsis* gene *ysl* encoding a DYW protein is required for editing of *rpoB* transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *Plant J.* 58: 82-96.
- Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C. (2010). An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 3245-3250.

Anhang 1: Begriffsdefinitionen Orthologie und Paralogie

Orthologie und Paralogie sind zwei Unterklassen der Homologie, die 1970 von Fitch eingeführt wurden.

Orthologie: Homologe, die infolge von Artbildung entstehen, werden als Orthologe bezeichnet. D. h., orthologe Gene (respektive Proteine) kommen in verschiedenen Spezies vor und spiegeln die Abstammung von einem letzten gemeinsamen Vorfahren wider (Fitch, 1970).

Paralogie: Durch Genduplikation innerhalb eines Genoms entstehen paraloge Gene (bzw. die von ihnen kodierten Proteine). Somit handelt es sich bei Homologen in einer Art um Paraloge (Fitch, 1970). Das Duplikationsereignis muss jedoch nicht notwendigerweise in dieser Art stattgefunden haben und auch Homologe in verschiedenen Arten können ihrer Entstehungsgeschichte nach paralog sein (Koonin, 2005).

Anhang 2: Verwendete Oligonukleotide

Tab. 3: Nukleinsäuresequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Ziel	Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
pDrive	M13-for	GTAAAACGACGGCCAGTG	Kolonie-PCR
pDrive	M13-rev	GGAAACAGCTATGACCATG	
Zea mays			
ppr5	ppr5-cDNAF3	AGCTGGTGCGCTCGCTGCT	ppr5-Expressionsanalyse (Abb. 12C)
ppr5	ppr5-cDNAR3	GGAGTAGATGCCGTTGTCAGC	
actin	actinF	GCCACTGATCCAGACACTGT	actin-Expressionsanalyse; run on-Sonde (Abb. 12C, 17)
actin	actinR	ATTCAGGTGATGGTGTGAGC	
ppr51	ppr51A1for1	GTGAACCGGAAGATCGCGTCC	Identifikation ppr51 (Abb. 20A)
ppr51	ppr51A1for2	GAAAGCGCTGTCCGTCATCCTCC	
ppr51	ppr51Drev1	GTTACCTTGTCTGGTTTGCATC	
ppr51	ppr51Drev2	CGATTCTTTGATGAGAAACC	
ppr51	51k18CDrev	GTTAGGCGGAATGCCCGCTCG	ppr51-Allele (Abb. 20B)
ppr51	51editCDrev	GTGTTAGGCAGAATGCCCGCTCT	
ppr51	51k18CDfor	GACCGCGTCGCGGCCCTC	
ppr51	51editCDfor	ACGACCGCATCGCGGCCCTT	
ppr51	51UTRfor	GCTCGGAATCTCATCTCATCC	ppr51-Genotypisierung (Abb. 20)
ppr51	PPR51Screen-F1	GGAGGTGAACCGGAAGATCG	Identifikation ppr51-Mutanten (Abb. 25, 26)
ppr51	PPR51Screen-R1	CGTCAATCATCGCCTGGAAG	
ppr51	PPR51Screen-F2	CAACTCCCCAAACCACCTCC	
ppr51	PPR51Screen-R2	CTCGTGCCATATCAGCCAGC	
ppr51	PPR51Screen-F3	TTGCAAGCCTGATGTGTGGA	
ppr51	PPR51Screen-R3	CCACCCTCCCATATGCATCC	
ppr51	PPR51Screen-R4	GGTTATGAGCTTGATGTATATGCC	
ppr51	PPR51Screen-R5	CAGACTCATTATCAAGAACAGAG	
ppr50	PPR50Screen-F1	CAGAAACCGTCTTCGTCCCC	Identifikation ppr50-Mutanten (Abb. 26)
ppr50	PPR50Screen-F2	GCTGATGATGCTCGGCAAGT	
ppr50	PPR50Screen-F3	CGGGTACACCTTCTCCGTCC	
ppr50	PPR50Screen-R1	GACTTGCGCAGCAATCAAC	
ppr50	PPR50Screen-R2	GTCCGGCACATTGCTACCAC	
ppr50	PPR50Screen-R3	CTGGCTCAACACCCATCAGC	
ppr50	PPR50Screen-R4	CTTTTCGATGTCGCCAGCAC	
ppr50	PPR50Screen-R5	GAACATGGCGGCCTTGCCGTA	
ppr50	PPR50Screen-R6	GGTAACGGCAGTTGGTGAGAAGA	
ppr50	PPR50Screen-R7	GCACTTGCCGAGCATCATCAGCA	
ppr50	PPR50-4rev	AAGGTTTCGTGGACTGCTGCC	
ppr50	PPR50-4for1	TCGCCGCTCATCGACCCTGT	
ppr50	PPR50-4for2	CAGCAAATCCACGGCCCTGC	
ppr50	PPR50for	ATGAACCTGCCGACGCCGCT	
ppr50	PPR50rev	GCAGCTTCATCCATCCCGTG	
ppr50	PPR50revSeq1	GCATCTCCCTGAAGAGGCCG	
ppr50	PPR50revSeq2	AAGACGGTTTCTGCCGCCGA	

<i>ppr54</i>	ScreenPPR54F1	ACGAGCGTCGATCTCCACTG	Identifikation <i>ppr54</i> -Mutanten (Abb. 32)
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54F2	TCGACAAGTGGGAGCTCTGC	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54F3	CATTCCCCTTCGGTTTCAGC	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R1	GCGCTCTGTCATCCAATCGT	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R2	TCAGCATGTGGAACACCACG	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R3	ACCGTACGTCCGCTTGTCTT	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R4	TTTTCTCCCGGCCTGTTGTT	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R5	GAAGCTCGGCTCCCTCGATA	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54F4	TGCTCCATCTCGTCACCTCC	
<i>ppr54</i>	ScreenPPR54R6	GAACTTCCGGAGCTCCTTGG	
<i>ppr54</i>	PPR54UTR	CACGAATCCTAAAGCACCAGACC	
<i>ppr54</i>	PPR54GenotypF1	GTGACTGTGAGATGTGCGGC	
<i>ppr54</i>	PPR54GenotypR1	GCCGCACATCTCACAGTCAC	
<i>ppr54</i>	PPR54GenotypR2	GATGAGAACCAATATCGAGGC	
<i>ppr54</i>	PPR54GenotypR3	CCATGTCACTCGATGAGAGAGG	
Mu-Transposon	eomu1	GCCTCCATTTCGTCTGAATCCC	Identifikation PPR-Mutanten
Mu-Transposon	eomu2	GCCTCTATTTCGTCTGAATCCG	
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>Atppr51</i>	PPR51_S14-AR	CATTACGTCCTCTGCATTGAT	Genotypisierung SALK-Linien
<i>Atppr51</i>	PPR51_S14-IR	GCCATTTGCTTTGTCTCGTCTC	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S14-RefF	TGGTTTCACTCTCCACCTCCAC	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S06-AF	GGGGAAATGGACAAATAGAAATG	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S06-IF	GGATTGAACCCAACATCAGAACC	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S06-RefR	TCGATGAAACGCAATACTCCTC	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S14- Reff2	GGGCCCCAAACTCATTATTTT	
<i>Atppr51</i>	PPR51_S14-AR2	GATGGAGATACAGCGGACGGTA	
<i>Atppr50</i>	PPR50_T-IF	GGTCAGGCTGGTGATTGGCTA	
<i>Atppr50</i>	PPR50_T-AF	CGCGTATAGCAAAGCAGGTCTT	
<i>Atppr50</i>	PPR50_T-RefR	CCTGGACTGCATCGAATATCCC	
T-DNA	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
T-DNA	LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
<i>Zea mays</i> Plastom			
<i>rrn23</i>	<i>rrn23F</i>	AAGGCCCCCTTAATGACCGCT	Herstellung einer Northern-Sonde (Abb. 13B)
<i>rrn23</i>	<i>rrn23R</i>	CGGCTCGAGGCATTTTCTCT	
<i>rrn16</i>	<i>rrn16F</i>	GGTGTTCAGTGGCGAACG	Herstellung von Northern- und <i>slot blot</i> -Sonden (Abb. 13B, 10B)
<i>rrn16</i>	<i>rrn16R</i>	TCCTACGGGAGGCAGCAGTG	
<i>rpl16</i>	<i>rpl16F</i>	CAACCTATTGCTTCGTATTGTCTG	Herstellung einer Northern-Sonde (Abb. 11)
<i>rpl16</i>	<i>rpl16R</i>	AATGAAATGAGAAGCGTGCGA	
<i>trnG-UCC</i> (Intron, 5')	<i>trnG-UCC2F</i>	TATCCAAAGACTAATTGAATTGC	Herstellung von Northern- und <i>slot blot</i> -Sonden (Abb. 11, 14, 10B)
<i>trnG-UCC</i> (Intron, 5')	<i>trnG-UCC2R</i>	GAATGAAATTAGGGAACGAAGTA	
<i>trnG-UCC</i> (Exon 2)	<i>trnG-UCC_probe</i>	CATCGTTAGCTTGGAAGGCTAGG	Northern- und <i>slot blot</i> -Sonde (Abb. 11, 14, 29, 30, 10B); Kartierung des 5'-Endes (Abb. 16B)
<i>trnG-UCC</i> (Exon 1)	<i>trnG-UCCex1</i>	CACACTTTTACCAAACTATACCCGC TAC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 14)
<i>trnG-UCC</i> (Intron, 3')	<i>trnG-UCCin3</i>	GTTATAGTCGACGTTGGTTGATTAT TTTTGACGTCTCTAATTCAAAACCG AACATGAAATTTTGATTTCATTCGG CTCCTTTATGGATATTCTCACCACT	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 14)
<i>trnG-UCC</i> (gesamt)	<i>trnG-UCC1F</i>	GCGGGTATAGTTTAGTGGTAAA	Herstellung einer <i>run on</i> -Sonde

Anhang 2

<i>trnG-UCC</i> (gesamt)	trnG-UCC_ex2	ATCGAACCCGCATCGTTAGC	(Abb. 17)
<i>trnG-UCC</i>	trnGPPE	TCGTTAGCTTGGAAGGCTAGG	<i>poisoned primer extension</i> (Abb. 15)
<i>trnG-UCC</i>	trnGPE	AAAGAGTTGGGTTTCCACC	<i>primer extension</i> (Abb. 18)
<i>trnG-UCC</i>	cRT-trnG-RT-R	CTTGGAAGGCTAGGGTTTTAC	Zirkularisierung (Abb. 16A)
<i>trnG-UCC</i>	cRT-trnG-F2	CGGGTTCGATTCCCGCTAC	
<i>trnG-UCC</i>	trnGex2rev	GCGGGTAGCGGGAATCGAAC	Kartierung des 5'-Endes (Abb. 16B)
<i>trnG-UCC</i>	trnG-UCCex-ex	AGGCTAGGGTTTTACCACTA	
<i>trnG-UCC</i>	trnG5endP3	ATCGAACCCGCATCGTTAGC	
(RNA-linker)	P1a	CGAATTCCTGTAGAACGAACACTA GAAG	
<i>trnG-GCC</i>	trnG-GCC_probe	ACCCGTATCTTCTCCTTGGCAA	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 14)
<i>trnV-GAC</i>	trnV-GAC_probe	CTTCCACCACGTCAAGGTGACACT CTACCGC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 11)
<i>trnD-GUC</i>	trnD-GUC_probe	CGAACCCGCAGCTTCCGCCTTGAC AGGGC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 11)
<i>trnV-UAC</i>	trnV-UACF	AGGGCTATAGCTCAGTTCGGT	Herstellung einer <i>run on</i> -Sonde (Abb. 17)
<i>trnV-UAC</i>	trnV-UACR	TAGGGCTATACGGAT	
<i>trnV-UAC</i>	trnV-UAC_probe	GTGTAAACGAGTTGCTCTACCGAA CTGAG	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 28 - 30)
<i>trnI-GAU</i>	trnI-GAU_probe	TGGGCCATCCTGGACTTGAACCAG AGACCTCGCCC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 28 - 30)
<i>trnA-UGC</i>	trnA-UGC_probe	TGGAGATAAGCGGACTCGAACC GC TGACATCCGCC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 29, 30)
<i>trnK-UUU</i>	trnK-UUU_probe	TTAAAAGCCGACTACTCTACCATTG AGTTAGCAACCC	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 29, 30)
<i>trnL-UAA</i>	trnL-UAA_probe	GAGCGACTTGAACCCTCACGACTT ATAAAGT	Northern-Oligonukleotid-Sonde (Abb. 29, 30)
<i>ndhA</i>	ndhAP3	GCGATTTCAAGTATTGCTCCT	RT-PCR über <i>ndhA</i> -3 (Abb. 33)
<i>ndhA</i>	ndhAP4	ATAAACCCCTATAGGCTGACGCC	
<i>ndhA</i> (reif)	ZmndhA-F1	GTACTAGCAATATCTCTACTATC	RT-PCR über <i>ndhA</i> -3 (Abb. 33)
<i>ndhA</i> (reif)	ZmndhA-R1	CAGAATATTCGGTTTGATAACC	
<i>ndhA</i> (Exon 1)	ZmndhAex1F	GCCCTCCTACTGGAATCAC	Herstellung einer Northern-Sonde (Abb. 34)
<i>ndhA</i> (Exon 1)	ZmndhAex1R	GATTGAGCAGCCGCTCGTAG	
<i>ndhA</i> (Intron)	ZmndhAinF	GTGAGGGATTAGGAACACTAAAG	Herstellung einer Northern-Sonde (Abb. 34)
<i>ndhA</i> (Intron)	ZmndhAinR	GGTATCATCCTCTGGGCATAG	
<i>ndhH</i>	ZmndhHF	GCCCTCAACACCCATCAATGC	Herstellung einer Northern-Sonde (Abb. 34)
<i>ndhH</i>	ZmndhHR	GAGATCGGCAGCGACTCCTC	
<i>Zea mays</i> Chondrom			
<i>cox1</i>	cox1F	TTCATCTTCGGTGCCATTGC	Herstellung einer <i>run on</i> -Sonde (Abb. 17)
<i>cox1</i>	cox1R	CCTGCCAGTACCGGAAGTGA	

Anhang 3: PPR5-RIP-Chip-Daten

Tab. 4: Die 25 Fragmente mit der höchsten relativen Anreicherung im PPR5-RIP-Chip

PCR-Fragment		PPR5		OEC		relative Anreicherung
Name	Nr.	$\log_2 \frac{F_{\text{Präzipitat}}}{F_{\text{Überstand}}}$	technische Replikate	$\log_2 \frac{F_{\text{Präzipitat}}}{F_{\text{Überstand}}}$	technische Replikate	
trnG-UCCex/int	25	-1,85	10	-6,84	9	5,00
trnD-GUC	34	-3,97	8	-6,30	10	2,33
trnV-GAC	197	-4,06	10	-5,94	10	1,87
trnV-UACex2int	97	-3,24	9	-4,90	8	1,67
trnGUCCintex1/ORF69	26	-4,36	7	-6,00	9	1,64
rpl23	171	-4,29	10	-5,81	9	1,52
rps8	157	-4,04	6	-5,43	10	1,39
rpoC1/C2	48	-4,33	10	-5,69	9	1,37
rps2B	54	-3,39	7	-4,75	9	1,36
petN3'	37	-3,36	9	-4,71	10	1,36
orf173-3'	180	-4,01	10	-5,30	10	1,29
rpl16-int	162	-4,32	10	-5,56	6	1,24
rpl2/rpl23	170	-4,21	10	-5,44	10	1,23
psaC/ndhE/ndhG	236	-2,60	5	-3,82	9	1,23
rpl14	159	-4,25	9	-5,39	8	1,13
rpl33	127	-3,38	8	-4,51	10	1,12
ORF69	27	-4,17	6	-5,26	9	1,09
rrn16-3'	200	-2,44	10	-3,53	8	1,09
rps3	163	-4,34	9	-5,32	8	0,98
ycf9	20	-3,94	9	-4,89	10	0,95
trnT-GGU/ trnEUCC5'	30	-4,34	9	-5,19	9	0,85
atpF1	61	-3,83	10	-4,64	9	0,81
rpl20/rps12int15'	130	-3,61	10	-4,42	9	0,81
trnL-UAG	227	-3,34	9	-3,78	9	0,44
ycf3ex1/trnS5'	81	-4,17	10	-4,52	8	0,35

Von den Daten, die der Abbildung 10A zugrunde liegen, sind die 25 Fragmente mit der höchsten relativen Anreicherung in PPR5-Präzipitat-Fraktionen gezeigt. Die auf dem Chip befindlichen PCR-Fragmente entsprechen den in Schmitz-Linneweber *et al.* (2005b) aufgeführten, die Nummer richtet sich nach der Position der Gene auf dem Mais-Plastom. PCR-Produkte, die den *trnG-UCC*-Lokus enthalten oder flankieren, sind durch Fettdruck hervorgehoben. Die Berechnung erfolgte wie unter Abb. 10A und Schmitz-Linneweber *et al.* (2005b) beschrieben. F bezeichnet die ermittelten Fluoreszenzwerte. Die Anzahl der technischen Replikate pro PCR-Produkt, deren Signalintensitäten die des Hintergrundsignals überschritten und die somit in die Berechnung eingegangen sind, ist angegeben.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CMS	zytoplasmatische männliche Sterilität
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyriboadenosintriphosphat
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat
ddCTP	Didesoxyribocytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYW	Bezeichnung einer Domäne in PPR-Proteinen mit charakteristischem Asparaginsäure-Tyrosin-Tryptophan-Tripeptid
E	<i>extended</i> , Bezeichnung einer Domäne in PPR-Proteinen
EBS	<i>exon binding site</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
g	Gramm
G	Guanin
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
<i>hcf</i>	<i>high chlorophyll fluorescence</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanolsulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Peroxidase aus Meerrettich)
IBS	<i>intron binding site</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	invertierte Repetition (auf dem Plastom)
kb	Kilobasenpaar(e)
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSC	<i>large single copy region</i> (großer Einzelkopiebereich auf dem Plastom)
m	Meter
M	molar (Mol pro Liter)
Mb	Megabasenpaare
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Murashige und Skoog
Mu	Mutator
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NEP	nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase

nt	Nukleotid(e)
Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OEC	<i>oxygen evolving complex</i> (Sauerstoff-produzierender Komplex)
ORF	offener Leserahmen
Os	<i>Oryza sativa</i>
P-Typ	Bezeichnung einer Gruppe von PPR-Proteinen bzw. -Genen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCMP	<i>plant combinatorial and modular protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	<i>primer extension</i>
PEP	plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PLS-Typ	Bezeichnung einer Gruppe von PPR-Proteinen bzw. -Genen
PML	<i>Photosynthetic Mutant Library</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPE	<i>poisoned primer extension</i>
PPR	<i>pentatricopeptide repeat</i> (Pentatricopeptid-Wiederholung)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RC	<i>reliability class</i> (Eingruppierung der Zuverlässigkeit bei TargetP)
Rf	<i>restorer of fertility</i>
RIP-Chip	RNA-Immunoprecipitation und Chip-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen je Minute
rPPR5	rekombinant exprimiertes PPR5
RRM	<i>RNA recognition motif</i> (RNA-Erkennungsmotiv)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkriptase bzw. reverse Transkription

RT-PCR	auf eine reverse Transkription folgende PCR
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
s	Sekunde
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMR	<i>small mutS related</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>small single copy region</i> (kleiner Einzelkopiebereich auf dem Plastom)
SSC	<i>standard saline citrate</i> (Natriumchlorid-Natriumnitrat-Puffer)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris <i>buffered saline</i> Tween 20
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPR	<i>tetratricopeptide repeat</i> (Tetratricopeptid-Wiederholung)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>units</i> (Enzymeinheiten)
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht translatierte Region
UV	ultraviolett (Licht)
V	Volt
v/v	Volumen in Volumen
WT	Wildtyp

w/v	Gewicht in Volumen
<i>ycf</i>	<i>hypothetical open reading frame</i>
Zm	<i>Zea mays</i>

Die Abkürzungen der Aminosäuren im Einbuchstabencode entsprechen der Standard-Aminosäurenomenklatur nach IUPAC. Chemische Elemente wurden den verbindlichen IUPAC-Empfehlungen folgend abgekürzt. Das Abkürzungsverzeichnis enthält die Abkürzungen für Maßeinheiten. Zur Bezeichnung ihrer dezimalen Vielfachen bzw. Teile wurden die SI-Vorsätze wie in DIN 1301 definiert verwendet.

Die vollständigen Schreibweisen von in dieser Arbeit genannten Genen, Proteinen und Mutanten sind den relevanten Publikationen zu entnehmen. Proteine wurden in Großbuchstaben (bzw. mit Großbuchstaben beginnend), Gene und Mutanten in Kleinbuchstaben und kursiv angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden vorrangig PPR-Proteine bzw. -Gene in Mais betrachtet. Bei der Bezeichnung der Orthologen aus *Arabidopsis*, Tabak und Reis wurden zur Unterscheidung die im Abkürzungsverzeichnis genannten Kürzel vorangestellt. Bei der Kennzeichnung von tRNAs wurde die Schreibung tRNA-Glycin für eine Glycinspezifische tRNA gewählt, in Klammern wurde das Antikodon angegeben.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema zu arbeiten und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Ich danke außerdem unseren Kooperationspartnern in Oregon, Prof. Dr. Alice Barkan und ihrer Arbeitsgruppe, für die zur Verfügung gestellten Mais-Samen der PML und die Antikörper sowie für die erfolgreiche Zusammenarbeit. Ebenso bin ich Prof. Dr. Ian Small für interessante wissenschaftliche Anregungen und die Kooperation dankbar.

Ich habe mich auf der Genetik-Etage stets wohl gefühlt, dafür danke ich Prof. Dr. Thomas Börner und den Arbeitsgruppen Genetik und Molekulare Ökologie. Für seinen Rat während des Schreibens dieser Arbeit bin ich Karsten Liere sehr dankbar. Auch Petra Dreier will ich nicht vergessen, die immer wieder in organisatorischen Fragen hilfreich war.

Selbstverständlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die schöne Atmosphäre im Labor und interessante Diskussionen bedanken, insbesondere bei Michi Tillich, Reimo Zoschke und Christiane Kupsch. Reik Modrozynski danke ich für seine TA-Fertigkeiten. Sehr herzlich möchte ich auch Sabrina Finster für die harmonische und immer fröhliche gemeinsame Arbeit am PPR50-Mais-Projekt danken, das Betreuen hat mir wirklich Spaß gemacht.

Am meisten zu Dank verpflichtet bin ich aber meiner lieben und lustigen Familie, die immer für mich da ist und mir stets ihr Vertrauen schenkt. Vor allem gilt meine Dankbarkeit meinem Mann Matthias, weil man gemeinsam so viel mehr versteht und schaffen kann und weil er mich sehr glücklich macht.

Wissenschaftliche Beiträge

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften

- Beick, S.**^{*}, Schmitz-Linneweber, C.^{*}, Williams-Carrier, R., Jensen, B. und Barkan, A. (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol. Cell. Biol.* 28: 5337-5347.
- Beick, S.**^{*}, Tillich, M.^{*} und Schmitz-Linneweber, C. (2010). Chloroplast RNA-binding proteins: repair and regulation of chloroplast transcripts. *RNA Biology* 7: 172-178.

^{*} geteilte Erstautorschaft

Konferenz-Vorträge

- Busch, S.**, Williams-Carrier, R., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2006). Neue Werkzeuge für einen alten Endosymbionten: Essentielle PPR-Proteine in Chloroplasten. 11. Jahrestagung der Deutschen Sektion der Gesellschaft für Endocytobiologie. 29.09. – 02.10.2006, Marburg, Deutschland.
- Beick, S.** und Schmitz-Linneweber, C. (2007). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 is essential for the stability of an unspliced tRNA precursor in maize chloroplasts. 18. Havel-Spree-Kolloquium. 16.11.2007, Berlin, Deutschland.

Konferenz-Poster

- Beick, S.**, Williams-Carrier, R., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 is essential for the stability of an unspliced tRNA precursor in maize chloroplasts. 20. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen. 26.02. – 29.02.2008, Dabringhausen, Deutschland.
- Beick, S.**, Williams-Carrier, R., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2008). Two closely related chloroplast PPR proteins bind intron containing tRNAs and are essential for embryo-development in *Arabidopsis*. 13. Annual Meeting of the RNA Society. 28.07. – 03.08.2008, Berlin, Deutschland.
- Beick, S.**, Williams-Carrier, R., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2008). Two closely related chloroplast PPR proteins bind intron containing tRNAs and are essential for embryo-development in *Arabidopsis*. Meeting SFB-TR1: Endosymbiosis. From Prokaryotes to Eukaryotic Organelles. 08.10. – 10.10.2008, München, Deutschland.
- Beick, S.**, Finster, S., Tillich, M., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2009). Closely related chloroplast PPR proteins: Conservation of targets and functions? Plant Genomics and Beyond Conference 2009. 05.07 – 08.07.2009, Evry, Frankreich.

Berlin, den 03.06.2010

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, gemäß §6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die dem angestrebten Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 03.06.2010